



UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

*Síntese, Caracterização e  
Avaliação Biológica de Compostos  
Multifuncionais Osteotrópicos*

Patrícia Raquel Henriques Serra Mendes

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM QUÍMICA INORGÂNICA BIOMÉDICA -

APLICAÇÕES EM DIAGNÓSTICO E TERAPIA

2012





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

# **Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Compostos Multifuncionais Osteotrópicos**

**Patrícia Raquel Henriques Serra Mendes**

Dissertação orientada pela Doutora Isabel Rego dos Santos e pela  
Doutora Célia Maria da Cuz Fernandes

**MESTRADO EM QUÍMICA INORGÂNICA BIOMÉDICA - APLICAÇÕES EM  
DIAGNÓSTICO E TERAPIA**

2012



Esta dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado em Química Inorgânica Biomédica - Aplicações em Diagnóstico e Terapia, organizado pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em parceria com o IST/ITN - Instituto Superior Técnico/Instituto Tecnológico e Nuclear.

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas na Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do IST/ITN, sob a orientação da Doutora Célia Maria da Cruz Fernandes e co-orientação da Doutora Isabel Rego dos Santos.



## Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Célia Fernandes, expresso o meu sincero e profundo reconhecimento, pelos conhecimentos transmitidos que muito ajudaram a minha formação científica, e pela forma rigorosa como orientou esta tese. A sua capacidade de discussão, disponibilidade, apoio e incentivo em todos os momentos foram determinantes para a realização deste trabalho. Por toda a amizade e compreensão, muito obrigada!

À Dra. Isabel Rego dos Santos agradeço a oportunidade que me concedeu para realizar este trabalho no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas, a sua permanente dedicação e a forma única como dirige este grupo de investigação, do qual é responsável. Agradeço também a amizade, todos os conhecimentos transmitidos e o entusiasmo com que co-orientou esta tese.

À Doutora Lurdes Gano agradeço o seu empenho na realização dos estudos de biodistribuição, assim como o apoio nos restantes ensaios biológicos *in vivo* e *in vitro*.

À Doutora Fernanda Marques agradeço o empenho na realização dos estudos em linhas celulares.

À Elisabete Correia agradeço a realização dos estudos de biodistribuição bem como a boa disposição constante.

Ao Doutor Joaquim Marçalo agradeço a realização de todos os espectros de massa apresentados neste trabalho.

Aos meus colegas do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas agradeço a colaboração, o incentivo, o bom ambiente de trabalho, a ajuda prestada e a amizade. Agradeço em especial à Sofia Monteiro, Susana Cunha, Carina Neto e ao Filipe Vultos que me ajudaram na adaptação da rotina do laboratório e na resolução de todas as dúvidas e dificuldades que surgiram ao longo do trabalho.

Aos restantes elementos do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas agradeço a simpatia com que me receberam.

Aos meus colegas da Faculdade de Ciências, em especial, à Isabel Rodrigues, agradeço a amizade, as “loucuras”, a partilha, a simplicidade e o apoio incondicional ao longo destes anos.

A todos os meus amigos agradeço de coração o estímulo e amizade.

Aos amigos especiais (eles sabem quem são) agradeço simplesmente a sua presença no meu caminho.

Aos meus sobrinhos agradeço todos os pequenos grandes momentos partilhados, que fortaleceram as minhas energias tornando as minhas semanas mais ricas.

Por fim, um agradecimento muito especial para os meus pais pois sem eles nada disto teria sido possível. Agradeço-lhes a confiança depositada, o constante incentivo, o encorajamento e ainda o esforço e sacrifício que me permitiram chegar onde cheguei. Agradeço ainda o exemplo de vida. Obrigada Pai! Obrigada Mãe!

Patrícia Mendes





## Resumo

Os Bifosfonatos (BPs) são uma família de compostos amplamente utilizados no tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo. Eles acumulam-se em áreas de elevada actividade metabólica, tais como metástases ósseas. BPs radiomarcados são usados para obtenção de imagens do osso ou para tratamento paliativo da dor óssea.

Com o objectivo de obter novos radiofármacos potencialmente úteis para Imagiologia Óssea, nomeadamente para detecção de metástases ósseas, e de forma a avaliar a influência do peso molecular e da carga global dos complexos nas suas propriedades osteotrópicas, foram sintetizados e caracterizados novos ligandos bifuncionais do tipo pirazolo-amina-pirazolo, pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxilato contendo um grupo bisfosfonato (Alendronato) ( $L^1$ ,  $L^3$ ). Estes ligandos foram utilizados para preparar complexos do tipo  $fac-[M(CO)_3(\kappa^3-L)]^+$  ( $L = L^1$ ;  $M = Re$  (**ReL1**),  $^{99m}Tc$  (**TcL1**)) e  $fac-[M(CO)_3(\kappa^3-L)]$  ( $L = L^3$ ;  $M = Re$  (**ReL3**),  $^{99m}Tc$  (**TcL3**)). Os complexos radioactivos **TcL1** e **TcL3** foram obtidos com rendimentos e pureza radioquímica elevados ( $\geq 90\%$ ) e foram identificados por comparação dos seus cromatogramas de RP-HPLC com os dos complexos análogos de  $Re$ .

Foram realizados estudos biológicos *in vitro* e *in vivo* para o complexo radioactivo **TcL3**. Os estudos *in vitro* de ligação à hidroxiapatite revelaram que o complexo possui potencial osteotrópico. Os estudos de biodistribuição de **TcL3** em ratinhos *Balb-c* confirmaram que este complexo é estável *in vivo*, não sofrendo metabolização ou oxidação e apresenta uma elevada fixação óssea (12,1% A.I./g 4h *p.i.*). O perfil biológico de **TcL3** foi comparado com o perfil biológico do radiofármaco em utilização clínica  $^{99m}Tc$ -MDP, estudado nas mesmas condições experimentais.



## Abstract

Bisphosphonates (BPs) are a family of compounds widely used in the treatment of disorders of bone metabolism. They accumulate in areas of high metabolic activity, such as bone metastases. Radiolabeled BPs are used to obtain images of the bone or for bone pain palliation.

Aiming to obtain new radiopharmaceuticals for bone imaging, potentially useful in particular for the detection of bone metastasis, and in order to evaluate the effects of molecular weight and net charge of the complexes on their bone-seeking properties, were synthesized and characterized novel bifunctional ligands of the type pyrazolyl-amine-pyrazolyl, pyrazolyl-diamine and pyrazol-aminocarboxylic bearing bisphosphonates (alendronate) ( $L^1$ ,  $L^3$ ). These ligands were used to prepare complexes of the type *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-L)]<sup>+</sup> (L =  $L^1$ ; M = Re (**ReL1**), <sup>99m</sup>Tc (**TcL1**)) and *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-L)] (L =  $L^3$ ; M = Re (**ReL3**), <sup>99m</sup>Tc (**TcL3**)). The radioactive complexes **TcL1** and **TcL3** were obtained with high yield and radiochemical purity (≥ 90%) and identified by comparison of their RP-HPLC chromatograms with those of the analogous Re complexes.

Biological studies have been performed *in vitro* and *in vivo* for **TcL3**. *In vitro* hydroxiapatite binding studies revealed that the complexes presented bone seeking potential. Biodistribution studies of **TcL3** in *Balb-c* confirmed that is stable *in vivo* and does not undergo oxidation or metabolization and has a high bone uptake (12.1% I.A./ g 4 h *p.i*). The biological profile of **TcL3** was compared with those of the radiopharmaceutical <sup>99m</sup>Tc-MDP in clinical use.



## Palavras-Chave

Radiofármacos

Complexos tricarbonilo de Re/<sup>99m</sup>Tc

Pirazolo

Bisfosfonatos

Cintigrafia óssea

Metástases ósseas

Terapia paliativa de metástases ósseas

## Keywords

Radiopharmaceuticals

Re/<sup>99m</sup>Tc tricarbonyl complexes

Pyrazole

Bisphosphonates

Bone scintigraphy

Bone metastases

Bone pain palliation



# Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Palavras-Chave .....	vii
Índice Geral .....	ix
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas .....	xiv
Índice de Esquemas.....	xiv
Símbolos e Abreviaturas.....	xv
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Cancro e as suas Modalidades Terapêuticas .....	1
1.1.1. A Quimioterapia .....	3
1.2. Medicina Nuclear - Considerações Gerais.....	4
1.2.1. Radionuclídeos .....	5
1.2.2. Radiofármacos .....	6
1.2.3. Diagnóstico versus Terapia .....	7
1.2.3.1. Técnicas de Aquisição de Imagem em Medicina Nuclear .....	8
1.3. Química e Radioquímica do Tecnécio e do Rénio relevantes para o Desenvolvimento de Radiofármacos.....	11
1.3.1. Tecnécio .....	11
1.3.1.1. Aspectos Básicos .....	11
1.3.1.2. Preparação de Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$ .....	12
1.3.1.3. Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$ .....	13
1.3.2. Rénio.....	16
1.4. Processo de Metastização Óssea .....	17
1.4.1. Tratamento Paliativo de Metástases Ósseas .....	18
1.4.2. Mecanismo de Acção dos Bisfosfonatos.....	18
1.5. Complexos de $^{99m}\text{Tc}$ e $^{186/188}\text{Re}$ para Visualização e/ou Terapia de Metástases Ósseas.....	21
1.6. Objectivos do trabalho.....	23
<b>2. Síntes, Caracterização e Avaliação Biológica de Compostos contendo um grupo Bisfosfonato</b>	<b>27</b>
2.1. Considerações Gerais.....	27
2.2. Síntese e Caracterização de Ligandos Bifuncionais contendo grupos bisfosfonatos .....	28
2.2.1. Síntese e caracterização do Ligando $L^1$ .....	28
2.2.2. Síntese e caracterização de $L^2$ e $L^3$ .....	32
2.2.2.1. Outras vias de síntese estudadas para $L^2$ .....	36

2.3. Síntese e Caracterização dos Complexos de Rénio: <b>ReL1</b> e <b>ReL3</b> .....	36
2.3.1. Síntese dos complexos <b>ReL1</b> e <b>ReL3</b> .....	37
2.3.2. Caracterização dos complexos <b>ReL1</b> e <b>ReL3</b> .....	37
2.3.3. Síntese e Caracterização do complexo de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ : <b>TcL1</b> e <b>TcL3</b> .....	39
2.4. Avaliação Biológica do Complexo de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ - <b>TcL3</b> .....	43
2.4.1. Estudos <i>in vitro</i> .....	43
2.4.1.1. Estabilidade em tampão fosfato salino pH 7,4 e em Soro Humano .....	43
2.4.1.2. Ligação às Proteínas Plasmáticas .....	44
2.4.1.3. Adsorção à Hidroxiapatite.....	45
2.4.1.4. Determinação da Lipofilia .....	46
2.4.2. Estudos <i>in vivo</i> .....	47
2.4.2.1. Biodistribuição .....	47
2.4.2.2. Estabilidade no sangue e na urina .....	50
2.4.3. Comparação com o $^{99m}\text{Tc}$ -MDP .....	51
2.4.4. Estudos em linhas celulares .....	52
<b>3. Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Parte Experimental .....</b>	<b>61</b>
4.1. Considerações Gerais.....	61
4.2. Preparação e Purificação de Solventes e Reagentes de Partida.....	61
4.2.1. Solventes.....	61
4.2.2. Reagentes.....	62
4.3. Técnicas de Purificação e Caracterização Química dos Compostos Sintetizados.....	62
4.4. Síntese dos Ligandos .....	66
4.4.1. Síntese de Compostos Orgânicos intermediários.....	66
4.4.1.1. Síntese do 1-(2-Bromoetil)-3,5-dimetil-1H-pirazolo .....	66
4.4.1.2. Síntese do N-terc-Butoxicarbonilo-2-bromoetilamina .....	66
4.4.1.3. Síntese do <i>terc</i> -butil-2-aminoetilcarbamato .....	67
4.4.1.4. Síntese do <i>terc</i> -butil-2-[2(3,5-dimetil-1H-pirazol-1 il)etilamino]etilcarbamato .....	67
4.4.1.5. Síntese do 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanoato de etilo .....	68
4.4.1.6. Síntese do Ácido 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanóico .....	68
4.4.1.7. Síntese do Ácido 4-{(2-aminoetil)[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanóico .....	69
4.4.1.8. Síntese do Alendronato ( <b>ALN</b> ) .....	69
4.4.1.9. Síntese do 4-(2-(3,5-dimetil-1H-pirazolo-1-il)etilamina)-1-hidroxibutano-1,1-ácido diildifosfónico .....	70
4.4.2. Síntese dos Ligandos Finais .....	71
4.4.2.1. Síntese de 4-(bis(2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)amino)-1-hydroxybutane-1,1-diylidiphosphonic acid ( <b>L<sup>1</sup></b> ) .....	71



4.4.2.2. Síntese de 4-((2-aminoethyl)(2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)amino)-1-hydroxybutane-1,1-diylidiphosphonic acid ( $L^2$ ) .....	72
4.4.2.3. Síntese de 2-((2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)(4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl)amino)acetic acid ( $L^3$ ) .....	72
4.5. Síntese dos Complexos de Rénio .....	73
4.5.1. Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> ( $\kappa^3L^3$ ) ( $ReL^1$ ) .....	73
4.5.1. Síntese do complexo <i>fac</i> -[Re(CO) <sub>3</sub> ( $\kappa^3L^1$ ) ( $ReL^3$ ) .....	74
4.6. Preparação de compostos Radioactivos - Síntese dos Complexos de <sup>99m</sup> Tc(I) .....	75
4.7. Estudos <i>In Vitro</i> .....	76
4.7.1. Determinação da Lipofilia pelo método de <i>shake flask</i> .....	76
4.7.2. Estabilidade in vitro .....	77
4.7.2.1. Estabilidade em PBS .....	77
4.7.2.2. Estabilidade em Soro Humano e Determinação da ligação às proteínas plasmáticas .....	77
4.7.3. Ligação à Hidroxiapatite .....	77
4.8. Estudos <i>In Vivo</i> .....	78
4.8.1. Ensaio de Biodistribuição .....	78
4.8.2. Estabilidade In Vivo /Metabolização .....	80
4.9. Estudos em Linhas Celulares .....	80
4.9.1. Inibição do crescimento celular (MTT) .....	80
<b>5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>83</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Ilustração das metodologias terapêuticas que recorrem ao efeito das radiações ionizantes para aniquilar um tecido tumoral .....	2
<b>Figura 1.2</b> - Esquema da utilização de uma fonte externa de radiação em radioterapia (esquerda) e de um radiofármaco (direita) em Medicina Nuclear .....	4
<b>Figura 1.3</b> - Relação entre a natureza da radiação e o seu poder de penetração.....	5
<b>Figura 1.4</b> - Esquema de um radiofármaco de perfusão (A) e de um radiofármaco específico (B) em que o radionuclídeo é um metal .....	6
<b>Figura 1.5</b> - Câmara gama com detector rotativo utilizada na técnica SPECT (A) e representação esquemática dos seus principais componentes (B). .....	9
<b>Figura 1.6</b> - Vista geral de uma câmara PET (A); (B) Representação esquemática da obtenção de imagem em PET. ....	9
<b>Figura 1.7</b> - Estrutura molecular da [ $^{18}\text{F}$ ]FDG .....	10
<b>Figura 1.8</b> - Gerador isotópico de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	11
<b>Figura 1.9</b> - Reconstituição de um dado kit e obtenção de um dado radiofármaco para uso clínico	12
<b>Figura 1.10</b> - Exemplo da comparação do comportamento cromatográfico em HPLC de complexos análogos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e de Re.....	13
<b>Figura 1.11</b> - Exemplos de radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em uso clínico .....	13
<b>Figura 1.12</b> - Estrutura dos radiofármacos específicos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Apcitide (a) e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Depreótido (b) e em utilização clínica.....	14
<b>Figura 1.13</b> - Exemplos de complexos com a unidade $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ .....	15
<b>Figura 1.14</b> - Tabela Periódica - Ampliação de uma fracção do bloco dos metais de transição, onde se observa o Tc e o Re, no grupo VII .....	16
<b>Figura 1.15</b> - Processo de Metastização.....	17
<b>Figura 1.16</b> - Estrutura geral dos bisfosfonatos ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ou $\text{OH}$ , $\text{R}_2 =$ grupo substituinte que interfere na sua acção biológica) .....	19
<b>Figura 1.17</b> - Estrutura química de bisfosfonatos .....	19
<b>Figura 1.18</b> - Processo de renovação óssea promovido pela acção dos osteoblastos e osteoclastos.	20
<b>Figura 1.19</b> - Exemplos de oxo-complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , $^{186}\text{Re}$ , e Re .....	21
<b>Figura 1.20</b> - Complexos de Tc(I) e Re (I) contendo um bisfosfonato .....	22
<b>Figura 1.21</b> - Imagem de corpo inteiro de rato Sprague Dawley, 2 h após injeção de [ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{pzNN-ALN})$ ] e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP, obtidas em câmara-gama.....	23
<b>Figura 2.1</b> - Estrutura dos complexos de Re/ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com ligandos do tipo pirazolo-diamina ou do tipo pirazolo-aminocarboxilato que se pretendiam funcionalizar com um bisfosfonato (Alendronato) com afinidade para o osso .....	27
<b>Figura 2.2</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o composto $\text{L}^1$ em $\text{D}_2\text{O}$ .....	29
<b>Figura 2.3</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto $\text{L}^1$ em $\text{D}_2\text{O}$ .....	30
<b>Figura 2.4</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (A) e de $^{31}\text{P}$ (B) do composto 2 em $\text{D}_2\text{O}$ .....	31
<b>Figura 2.5</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (A), $^{13}\text{C}$ (B) e $^{31}\text{P}$ (C) do ligando $\text{L}^3$ em $\text{D}_2\text{O}$ .....	34
<b>Figura 2.6</b> - ESI-MS do composto $\text{L}^3$ no modo positivo .....	35

<b>Figura 2.7</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto $\text{L}^2$ em $\text{D}_2\text{O}$ .....	35
<b>Figura 2.8</b> - Espectros de Massa obtido em modo negativo (A) e de RMN de $^{31}\text{P}$ (B) do complexo ReL3, em $\text{D}_2\text{O}$ .....	39
<b>Figura 2.9</b> - Radiocromatograma do precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ .....	40
<b>Figura 2.10</b> - Cromatogramas de HPLC dos complexos TcL3 (detecção $\gamma$ ) e ReL3 (detecção UV) ....	42
<b>Figura 2.11</b> - Radiocromatograma de TcL3 em (A) MeOH/HCl 6 N (95/5) e (B) Acetona .....	42
<b>Figura 2.12</b> - Cromatogramas de HPLC de TcL3 (detecção $\gamma$ ), antes de incubar (A), após 1 hora e 6 horas de incubação em PBS pH 7, (B e C respectivamente). ....	43
<b>Figura 2.13</b> - Cromatogramas de HPLC de TcL3 (detecção $\gamma$ ), após 1 hora, 4 e 6 horas de incubação em soro humano (A e B respectivamente) .....	44
<b>Figura 2.14</b> - Ligação do complexo TcL3 às proteínas plasmáticas .....	44
<b>Figura 2.15</b> - Percentagem de ligação de TcL3 à HA (1 h de incubação a $37^\circ\text{C}$ ) (n=3) .....	45
<b>Figura 2.16</b> - Fixação nos órgãos mais relevantes para o complexo TcL3 .....	49
<b>Figura 2.17</b> - Percentagem de Fixação óssea do complexo TcL3 em função do tempo .....	49
<b>Figura 2.18</b> - Razão de actividade no órgão alvo vs órgão não alvo para TcL3 em ratinhos <i>Balb-c</i> ...	49
<b>Figura 2.19</b> - Cromatogramas de HPLC da preparação inicial do complexo TcL3, da urina e do sangue de ratinhos recolhidos 1h <i>p.i</i> deste complexo (detecção $\gamma$ ) .....	50
<b>Figura 2.20</b> - Biodistribuição (%A.I./g órgão) de TcL3 e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	51
<b>Figura 2.21</b> - Percentagem de Fixação óssea do complexo TcL3 e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP em função do tempo	51
<b>Figura 2.22</b> - Excreção total (%A.I.) do s complexo TcL3 e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP, em ratinhos <i>Balb-c</i> , em função do tempo .....	52
<b>Figura 2.23</b> - Razão de actividade no órgão alvo (osso) vs órgão não alvo para TcL3 e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	52
<b>Figura 2.24</b> - Inibição da proliferação de células MDAMB231 em função da concentração de (A) $\text{L}^1$ e ReL1 e (B) $\text{L}^3$ e ReL3 .....	53
<b>Figura 2.25</b> - Inibição da proliferação de células MDAMB231 em função da concentração de ALN ...	53

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Características físicas de alguns radionuclídeos com interesse em terapia .....	7
Tabela 1.2 - Radiofármacos aprovados para uso clínico em terapia .....	8
Tabela 2.1 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ do complexo ReL1 .....	37
Tabela 2.2- Percentagem de ligação a 15mg de HA, determinada para o complexo TcL3, em função do tempo de incubação a 37°C .....	46
Tabela 2.3 - Valores de Log $D_{O/A}$ determinados para o complexo de $^{99m}\text{Tc}$ (TcL3).....	46
Tabela 2.4 - Resultados de biodistribuição (% A.I./órgão) e excreção total (%A.I.) após administração do complexo TcL3 em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	47
Tabela 2.5 - Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) após administração do complexo TcL3 em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	48
Tabela 4.1 - Resultados de biodistribuição (% A.I./órgão) após administração do complexo TcL3 em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	79
Tabela 4.2 - Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) após administração do complexo TcL3 em ratinhos <i>Balb-c</i> .....	79

## Índice de Esquemas

Esquema 2.1 - Síntese de $L^1$ e do composto 2.....	28
Esquema 2.2 - Síntese de $L^2$ e $L^3$ .....	32
Esquema 2.3 - Síntese dos complexos ReL1 e ReL3.....	36
Esquema 2.4 - Síntese do precursor organometálico $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ .....	40
Esquema 2.5 - Síntese dos complexos $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}L^1]$ (TcL1) e $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}L^3]$ (TcL3).....	41

## Símbolos e Abreviaturas

A.I./g	Actividade injectada por grama de órgão
ALN	Alendronato
BP	Bisfosfonato
BM	Biomolécula ou molécula biologicamente activa
Boc	terc-butoxicarbonilo
Bq	Becquerel
Ci	Curie
CE	Captura electrónica
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
d	Dupleto
dps	Desintegração por segundo
E <sub>max</sub>	Energia Máxima
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
Et	Etilo
<i>fac</i>	Facial
[ <sup>18</sup> F]FDG	[ <sup>18</sup> F]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose
g	Gramas
h	Hora
HA	Hidroxiapatite
HMDP	Ácido 1-hidroximetano-1,1-difosfónico
HMPAO	Hexametilopropilenoamino oxima
Hz	Hertz
ITLC	Cromatografia em camada fina instantânea
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento (em Hertz) entre dois núcleos
L	Ligando
Log D	Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água
LET	Transferência linear de energia
m	Multiplete
MDP	Ácido metilenodifosfónico ou medronato
Me	Metilo
MeOH	Metanol
min	Minuto
mm	Milímetros
NEt <sub>3</sub>	Trietilamina
PAM	Pamidronato

PBS	Tampão fosfato salino
PET	Tomografia de emissão de positrões
Ph	Grupo fenilo
<i>p.i.</i>	Após injeccao ( <i>post-injection</i> )
$P_{o/w}$	Coeficiente de partição octanol/água
ppm	partes por milhão
pz	Pirazolo
q	Quarteto
RM	Ressonância Magnética
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
s	Singuleto
SPECT	Tomografia computadorizada de fóton único
TAC	Tomografia Axial Computorizada
TI	Transição isomérica
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
$t_{1/2}$	Período de semi-desintegração
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina
$t_R$	Tempo de retenção
US	Ultra-sonografia
UV	Ultravioleta

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$\delta$	Desvio químico
$\gamma$	Gama
$\lambda$	Lambda
$\eta$	Rendimento
$k^n$	Hapticidade de um ligando
$\nu$	Frequência de vibração

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO





# 1. Introdução

Nas sociedades ocidentais tem-se observado um aumento significativo da longevidade das populações o que conduz a uma maior incidência das doenças cardiovasculares e das doenças do foro oncológico. No domínio da oncologia, o desenvolvimento de metástases ósseas tem merecido especial atenção visto que provocam complicações severas tais como, dor óssea, fracturas patológicas, hipercalcémia e compressão da medula espinal. As metástases ósseas ocorrem em quase todos os tumores primários, sendo o tumor da próstata e o da mama os que mais metastizam (65 a 75 %) <sup>[1,2]</sup>. Tendo em consideração a elevada frequência com que ocorre a metastização e a diminuição da qualidade de vida daí decorrente, as metástases ósseas constituem um problema de saúde pública de grande relevância.

## 1.1. Cancro e as suas Modalidades Terapêuticas

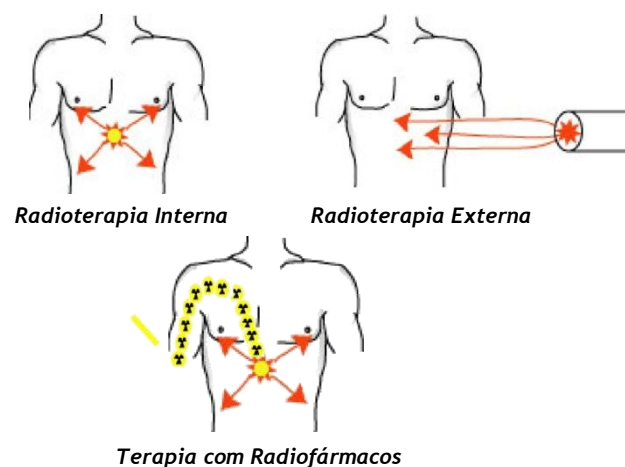
Um tumor (neoplasma) é o termo geral utilizado para designar um crescimento não controlado de células que se torna progressivamente pior com o tempo. Ao falarmos em tumor é necessário ter em mente que podemos estar a referir-nos a uma alteração ao nível celular, que pode ser maligna ou benigna. A diferença entre o *tumor benigno* e *tumor maligno* é a sua capacidade de gerar metástases, ou seja, um tumor que não metastiza ou invade os tecidos vizinhos designa-se por tumor benigno, enquanto que aquele que tem a capacidade de metastizar ou invadir os tecidos vizinhos define-se como tumor maligno. <sup>[3]</sup>

As células neoplásicas comparativamente com as células normais apresentam algumas alterações ao nível: 1) da **morfologia** - a falta de diferenciação é caracterizada por algumas alterações morfológicas e funcionais, deste modo, os tumores benignos são geralmente bem diferenciados enquanto que os tumores malignos podem ser mais ou menos diferenciados, mas apresentam sempre perda de diferenciação; normalmente o núcleo contém um excesso de DNA e é desproporcionadamente grande em relação à célula (razão núcleo:citoplasma cerca de 1:1 em vez de 1:4 ou 1:6, como nas células normais); existe um grande nº de células em mitose, em que algumas mitoses são atípicas; por vezes apresentam alterações a nível cromossomal, quer a nível numérico quer a nível estrutural; 2) do **crescimento celular** - o crescimento das células tumorais é independente de factores de crescimento; 3) do **metabolismo celular** - as células cancerosas têm uma alteração irreversível no mecanismo respiratório, que aumenta a produção de ácido láctico, mesmo na presença de oxigénio; o consumo de glucose é maior (o lactato tende a ser convertido em glucose no fígado através da gluconeogénese); por cada molécula de glucose formada são consumidas 6 mol de ATP, obtendo-se apenas 2 mol de ATP na oxidação da glucose nas células cancerosas e 4) das **interacções intercelulares** - as células tumorais perdem a especificidade de contacto com outras células e por conseguinte a inibição de contacto. A perda de especificidade do contacto entre as células favorece a capacidade de invasão e por sua vez a metastização. <sup>[3]</sup>

A dificuldade em controlar o cancro surge porque as células neoplásicas que se libertam da massa tumoral onde a instabilidade genética teve origem - **tumor primário**- proliferam em estreita associação com o tecido estranho para onde migraram, dando origem a metástases (tecido neoplásico de menores dimensões que prolifera de forma descontrolada). Este comportamento é diferente do apresentado pelas células normais que, ao se libertarem ocasionalmente do seu tecido originário, morrem em vez de proliferar. <sup>[4]</sup>

Hoje em dia, são conhecidos diversos tratamentos para o combate ao cancro, nomeadamente, a quimioterapia (fármacos administrados por via oral ou por via intravenosa), a radioterapia (destruição das células cancerígenas por meio da radiação - utilização de feixes de partículas ionizantes direccionadas aos tecidos tumorais), a cirurgia (remoção de parte ou todo o órgão atingido) e finalmente a imunoterapia (o paciente é estimulado artificialmente a produzir anticorpos e citocinas).

Enquanto que um tumor primário é algo que se detecta e se erradica de modo cada vez mais eficaz, as metástases são massas tumorais com dimensões da ordem dos milímetros e que se encontram dispersas ao longo do organismo, dificultando significativamente a sua detecção e aniquilação, e sendo por isso responsáveis pela morte de aproximadamente 60% dos pacientes a quem é detectado cancro. Assim, actualmente o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas antitumorais passa pela tentativa de erradicação de metástases. A terapia das metástases exige que o agente terapêutico se fixe no tecido metastizado, ao nível celular, de modo a conduzir à sua morte. Assim, é necessário recorrer a modalidades terapêuticas com carácter sistémico, nomeadamente, a **quimioterapia**, a **imunoterapia**, a **hormonoterapia** ou a **terapia dirigida com radiofármacos**.<sup>[5]</sup> Em todas estas modalidades terapêuticas são utilizadas moléculas que, embora sejam de natureza diferente, se distribuem de forma sistémica pelo organismo podendo chegar de forma eficaz aos tecidos a eliminar. O carácter sistémico dos radiofármacos para terapia torna a sua utilização fundamentalmente diferente das outras metodologias que também recorrem ao efeito das radiações ionizantes para eliminar tecido tumoral, como é o caso da radioterapia externa ou da braquiterapia, como evidenciado na figura 1.1.



**Figura 1.1** - Ilustração das metodologias terapêuticas que recorrem ao efeito das radiações ionizantes para aniquilar um tecido tumoral.

Os agentes quimioterapêuticos interferem em geral com os processos de divisão celular, mediante interacção com o DNA. O facto de as células tumorais sintetizarem o DNA com mais frequência do que as células normais torna as células tumorais mais susceptíveis de sofrerem a acção citotóxica destas moléculas. O desenvolvimento de resistência (intrínseca ou adquirida após tratamento prolongado) e a falta de toxicidade selectiva, que conduz ao aparecimento de pronunciados efeitos secundários, têm limitado a utilização destes agentes terapêuticos.

A terapia com radiofármacos surge como uma alternativa terapêutica atractiva, em particular no caso dos tumores quimioresistentes na medida em que os diferentes radiofármacos actualmente aprovados para uso clínico em terapia antitumoral, incorporam radionuclídeos emissores  $\beta^-$ , que devido ao efeito radiotóxico da radiação  $\beta^-$  que é emitida não se encontram sujeitos aos mecanismos de resistência responsáveis pela perda da eficácia dos agentes quimioterapêuticos. No entanto, a utilização de emissores  $\beta^-$  também conduz à irradiação das células saudáveis adjacentes às massas tumorais que captam os radiofármacos, provocando efeitos secundários indesejáveis.<sup>[10]</sup>

### 1.1.1. A Quimioterapia

O termo quimioterapia refere-se ao tratamento de doenças por substâncias químicas que afectam o funcionamento celular.<sup>[3]</sup>

Os agentes quimioterapêuticos são moléculas orgânicas, inorgânicas ou organometálicas que exercem um pronunciado efeito citotóxico sobre as células do tecido tumoral. De modo a aumentar a sua eficácia na destruição desse mesmo tecido, a quimioterapia pode ser combinada com a cirurgia e com a radioterapia externa.

A generalidade dos agentes quimioterapêuticos aprovados para uso clínico apresenta falta de toxicidade selectiva para as células tumorais. Assim, existem algumas dificuldades inerentes ao uso de agentes quimioterapêuticos, nomeadamente, a dificuldade de acesso ao tumor por via sistémica (massas tumorais pouco irrigadas). A dificuldade de acesso ao tumor, associada à falta de especificidade, condicionam assim a dose de agente quimioterapêutico que se pode administrar ao paciente, ficando o respectivo efeito farmacológico limitado. Outro dos problemas prende-se com o facto das células cancerígenas poderem ser intrínsecamente resistentes ou tornarem-se resistentes depois de um tratamento repetido com um determinado agente quimioterapêutico.<sup>[6]</sup>

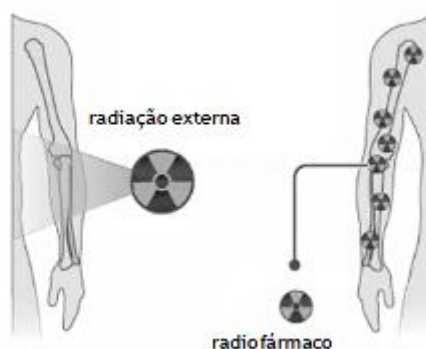
De modo a ultrapassar estas desvantagens têm sido feitos esforços no sentido de ligar ao agente quimioterapêutico convencional um vector biológico com afinidade para dados receptores sobreexpressos nas células neoplásicas, de modo a promover uma acumulação selectiva do fármaco no tecido tumoral.<sup>[6]</sup>

## 1.2. Medicina Nuclear - Considerações Gerais

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza radiofármacos em aplicações de diagnóstico ou de terapia. A Medicina Nuclear é actualmente uma das especialidades com grande relevo no âmbito da imagiologia médica, a par de técnicas como a Tomografia Axial Computorizada (TAC), a Ressonância Magnética (RM) ou a Ultra-sonografia (US).

Em Medicina Nuclear, a obtenção de imagens é conseguida através da administração de moléculas, designadas por radiofármacos, que contêm na sua composição um radionuclídeo. A grande vantagem das técnicas de Medicina Nuclear é a sua elevada sensibilidade, que permite usar concentrações muito baixas de radiotraçadores ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M) não provocando efeitos farmacológicos ou a alteração dos processos fisiológicos a avaliar. Este carácter não invasivo e a possibilidade de visualizar *in vivo* processos fisiológicos associados a diferentes patologias explicam a importância crescente da Medicina Nuclear.<sup>[7]</sup>

Do ponto de vista do paciente, os procedimentos envolvidos na aquisição de imagens em Medicina Nuclear são simples, sendo a dose de radiação a que o paciente fica submetido inferior à recebida durante a realização de uma radiografia ou de uma TAC. Como se pode observar pela figura 1.2, a fonte radioactiva encontra-se no interior do paciente, ao contrário da radiografia convencional em que se utilizam raios-x provenientes de uma fonte externa ou ainda da radioterapia em que se utiliza radiação gama externa.<sup>[8,9]</sup>



**Figura 1.2** - Esquema da utilização de uma fonte externa de radiação em radioterapia (esquerda) e de um radiofármaco (direita) em Medicina Nuclear.

Os compostos com aplicação radiofarmacêutica, devem ser adequados para a administração em pacientes, estáveis *in vivo* e, idealmente, selectivos para o órgão alvo. Estes compostos são geralmente preparados sob a forma de uma solução injectável e a sua estabilidade é avaliada face à ocorrência ou não de processos de hidrólise, oxidação, redução, transquelatação e/ou transmetalção. A selectividade e a farmacocinética dos compostos são avaliadas através de estudos de biodistribuição *in vivo*, sendo que a farmacocinética depende de factores como, a solubilidade/lipofilia, carga ou peso molecular.<sup>[10-12]</sup>

A selecção do radionuclídeo, em função das suas características nucleares, é fundamental pois determina a aplicabilidade do radiofármaco em diagnóstico ou terapia.

### 1.2.1. Radionuclídeos

Entende-se por nuclídeo uma espécie nuclear que é caracterizada pelo seu número atómico,  $Z$ , e pelo seu número de massa,  $A$ , ou seja, pelo número de prótons e de neutrões existentes no núcleo. A convenção para expressar a composição nuclear de um elemento  $X$  é a seguinte:<sup>[13]</sup>

$${}^A_Z X_N$$

$X$  = Símbolo químico       $Z$  = Número atómico  
 $A$  = Número de massa       $N$  = Número de neutrões =  $A - Z$

Quando um dado nuclídeo é instável, este transforma-se espontaneamente noutro que é mais estável, com emissão de partículas carregadas e/ou de radiação electromagnética (raios- $\gamma$  ou raios-X), sendo então designado por **radionuclídeo**.

Existem diferentes processos associados ao decaimento de um radionuclídeo para um estado mais estável, são estes: a fissão espontânea, a emissão de partículas alfa ( $\alpha$ ), positrões ( $\beta^+$ ) ou beta menos ( $\beta^-$ ), a captura electrónica (CE) e a transição isomérica (TI).

A radiação emitida nos diferentes processos de decaimento referidos, quando interage com a matéria, pode provocar ionização dos átomos, no entanto, a capacidade de ionização e o poder de penetração da radiação na matéria dependem da massa, da carga e da energia das partículas e/ou radiação electromagnética. Na figura 1.3 é ilustrado o poder de penetração de diferentes tipos de radiação em diversos materiais e tecidos biológicos.<sup>[13,14]</sup>

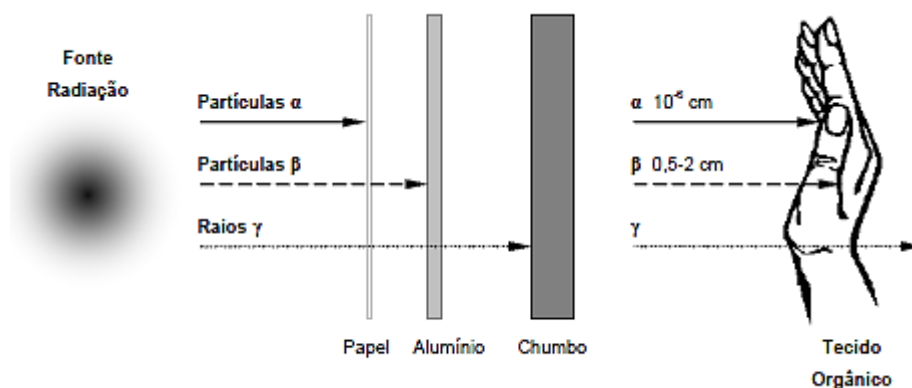


Figura 1.3 - Relação entre a natureza da radiação e o seu poder de penetração.<sup>[25]</sup>

A unidade de actividade no Sistema Internacional (SI) é o Becquerel (Bq), definido como uma desintegração por segundo (dps). No entanto, a radioactividade é também frequentemente expressa na unidade Curie (Ci), que é igual a  $3,7 \times 10^{10}$  desintegrações por segundo.

### 1.2.2. Radiofármacos

Os radiofármacos são formulações farmacêuticas, sem acção farmacológica, que têm na sua composição um isótopo radioactivo (radionuclídeo) de um elemento metálico ou não metálico. Estes compostos são utilizados no diagnóstico ou terapia de doenças, dependendo da natureza e energia da radiação emitida. São administrados normalmente por via intravenosa ao paciente e distribuem-se pelo organismo fixando-se num tecido ou órgão alvo. Actualmente, são utilizados essencialmente na vertente de diagnóstico para avaliação de alterações fisiológicas e/ou alterações anatómicas associadas ao desenvolvimento de diferentes patologias.<sup>[15]</sup>

Relativamente à biodistribuição, os radiofármacos podem ser genericamente subdivididos em duas categorias, designadamente, **radiofármacos de 1ª geração** ou **agentes de perfusão** e **radiofármacos de 2ª geração** ou **específicos**. Nos radiofármacos de 1ª geração assume-se que a farmacocinética e a selectividade são exclusivamente influenciadas pelas propriedades físico-químicas dos complexos formados, nomeadamente, pelo seu peso molecular, carga e lipofilia. A maioria dos radiofármacos em utilização clínica são de perfusão.

Os radiofármacos de 2ª geração, ou específicos, contêm uma biomolécula (BM) (anticorpo monoclonal, péptido regulador, agonista ou antagonista de receptores específicos, etc) com afinidade para alvos moleculares associados a determinados estados patológicos. Desta forma, a distribuição e fixação do radiofármaco nos tecidos e órgãos alvos são determinadas não só pelas suas propriedades físico-químicas, mas também pela capacidade que a biomolécula tem em reconhecer os seus alvos específicos *in vivo*.<sup>[19]</sup>

Quando o radionuclídeo é um metal, a concepção de radiofármacos específicos envolve usualmente um agente quelante bifuncional com capacidade para estabilizar o centro metálico e, simultaneamente, adequado para a ligação a uma dada biomolécula. Estes radiofármacos devem apresentar uma elevada *actividade específica* - actividade por unidade de massa do agente quelante bifuncional contendo a biomolécula, pois um excesso do agente quelante bifuncional, que está ligado à biomolécula, pode saturar os receptores aos quais se deveria ligar o radiofármaco.

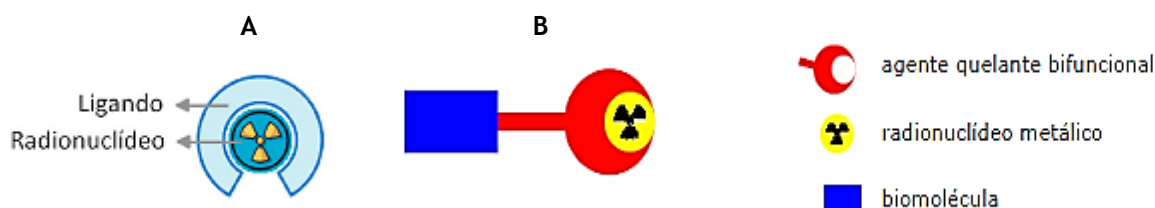


Figura 1.4 - Esquema de um radiofármaco de perfusão (A) e de um radiofármaco específico (B) em que o radionuclídeo é um metal.

### 1.2.3. Diagnóstico versus Terapia

A escolha de um determinado radionuclídeo para utilização em diagnóstico ou terapia deve assentar em parâmetros, como: tipo e energia da radiação e/ou partículas emitidas; período de semi-desintegração ( $t_{1/2}$ ); actividade específica; facilidade de obtenção pelo utilizador; facilidade de produção, com o mínimo custo possível e eficiência de detecção da radiação emitida.

Os **radiofármacos para terapia** incorporam radionuclídeos que libertam doses citotóxicas de radiação ionizante, isto é, um radionuclídeo emissor de radiações com um elevado valor de LET (Transferência Linear de Energia), grandeza que mede a energia depositada pela radiação por unidade de matéria atravessada e que é expressa usualmente em keV/ $\mu\text{m}$  de modo a destruir células ou tecidos que deverão captar os radiofármacos de forma selectiva. Os radionuclídeos com interesse em terapia podem ser emissores de partículas  $\beta^-$ ,  $\alpha$  ou electrões Auger.<sup>[8]</sup>

A selecção de um radionuclídeo para terapia é também fortemente condicionada pelo alcance das partículas, pois esse alcance deve ser ajustado às dimensões do tumor ou tecido que se pretende irradiar e, conseqüentemente, erradicar. As partículas  $\beta^-$  têm um alcance de milímetros sendo ideais para tumores maiores, enquanto as partículas  $\alpha$  são mais eficazes na eliminação de tumores pequenos e metástases devido ao seu alcance inferior (50-100  $\mu\text{m}$ ).

Na tabela 1.1 apresentam-se exemplos de emissores  $\beta^-$  para os quais já existem radiofármacos aprovados para terapia ou com interesse potencial para esse fim (ex.  $^{188}\text{Re}$ ).

Tabela 1.1 - Características físicas de alguns radionuclídeos com interesse em terapia.<sup>[60]</sup>

Radionuclídeo	$t_{1/2}$	$E_{\text{max}}$ [MeV]	Alcance em tecidos
<b>Emissores <math>\beta^-</math></b>			
Ag-111	7,5 d	1,05	4,8 mm
Cu-67	2,6 d	0,57	4,8 mm
I-131	8,0 d	0,81	2,0 mm
Lu-177	6,7 d	0,50	1,5 mm
P-32	14,3 d	1,71	8,7 mm
Re-186	3,8 d	1,07	5,0 mm
Re-188	17,0 h	2,11	11,0 mm
Y-90	2,7 d	2,27	12,0 mm

Os radiofármacos para terapia devem ser eliminados rapidamente dos tecidos normais e do organismo, para que o paciente seja exposto à menor dose possível, minimizando os efeitos secundários indesejáveis.

O [ $^{131}\text{I}$ ]NaI foi o primeiro radiofármaco a ser aprovado para uso clínico, tendo despertado o interesse pela medicina nuclear, devido à sua franca capacidade para levar à remissão dos tumores da tiróide por via da acumulação preferencial do iodo neste órgão. Actualmente, todos os radiofármacos aprovados para uso terapêutico contêm radionuclídeos emissores de partículas  $\beta^-$ , sendo apresentados alguns exemplos na tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Radiofármacos aprovados para uso clínico em terapia.<sup>[24]</sup>

Radiofármaco	Indicação Terapêutica
[ <sup>32</sup> P]-fosfato de sódio	Paliativo da dor em metástases ósseas Mieloproliferação desregulada
[ <sup>89</sup> Sr]-cloreto de estrôncio (Metastron)	Paliativo da dor em metástases ósseas
[ <sup>153</sup> Sm]-lexidronam (Quadramet)	Paliativo da dor em metástases ósseas
[ <sup>131</sup> I]-iodeto de sódio (Iodotope)	Cancro da tiróide; Hipertiroidismo
[ <sup>131</sup> I]-metaiodobenzilguanidina (MIBG)	Tumores neuroendócrinos
[ <sup>131</sup> I]-tositumomab (Bexxar) <sup>111</sup> In/ <sup>90</sup> Y-Ibritumomabtixetan (Zevalin)	Tratamento dos linfomas non-Hodgkin's

Na tentativa de desenvolver radiofármacos mais eficientes e mais selectivos, de modo a expandir as possibilidades terapêuticas da medicina nuclear, foram realizados inúmeros estudos com anticorpos marcados com emissores  $\beta^-$ . O anticorpo marcado deve reconhecer selectivamente um dado antigénio expresso pelas células tumorais a aniquilar, conduzindo a uma acumulação preferencial do radionuclídeo nessas células. Esta modalidade terapêutica é designada por radioimunoterapia (RIT), esperando-se que a acção conjugada da radiotoxicidade do radionuclídeo e dos efeitos citotóxicos inerentes à presença do anticorpo, aumente a eficácia terapêutica.

Os **radiofármacos para diagnóstico** são uma ferramenta que permite, de um modo não invasivo, diagnosticar patologias, averiguar a gravidade das mesmas e acompanhar processos terapêuticos, através da aquisição de imagens. Estes por sua vez, devem incluir na sua composição um radionuclídeo emissor  $\gamma$  ou emissor de positrões (partículas  $\beta^+$ ) com um tempo de semi-desintegração comparável à duração do exame em causa. Assim, é possível diminuir a dose administrada sem prejuízo da estatística de contagem, principalmente no caso de radiofármacos com elevada taxa de retenção biológica.

Relativamente aos métodos de aquisição de imagem em Medicina Nuclear utilizam-se duas técnicas, a Tomografia de Emissão de Fóton Único (SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) e a Tomografia por Emissão de Positrões (PET, *Positron Emission Tomography*).

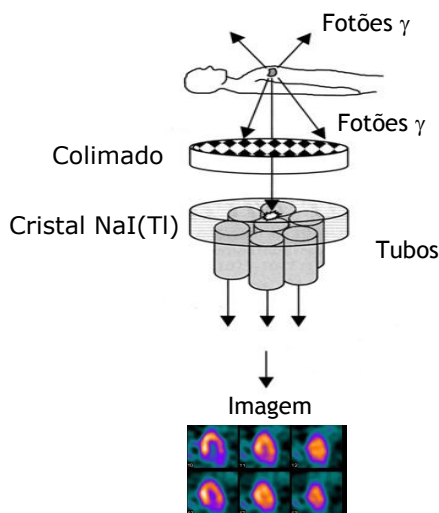
#### 1.2.3.1. Técnicas de Aquisição de Imagem em Medicina Nuclear

A técnica SPECT é uma técnica de imagiologia médica que permite a detecção de fótons  $\gamma$ , com energia idealmente compreendida entre 100 e 150 KeV. A imagem tomográfica da distribuição da radiação é obtida à medida que uma câmara gama, constituída por um cristal único de NaI(Tl), vai rodando em torno do paciente, permitindo assim obter imagens nos diversos planos anatómicos (figura 1.5). Assim, no SPECT, obtém-se uma sucessão de cintigrafias segundo várias projecções que, após adequada reconstrução de imagem, fornecem a distribuição tridimensional do radiofármaco numa dada região de interesse.<sup>[10]</sup>





(A)



(B)

**Figura 1.5** - Câmara gama com detector rotativo utilizada na técnica SPECT (A) e representação esquemática dos seus principais componentes (B).

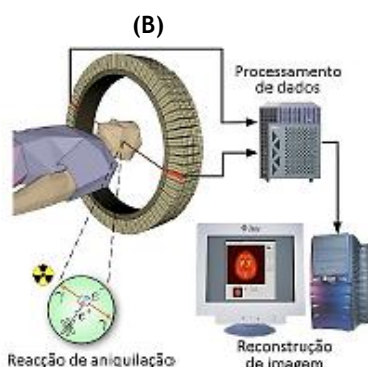
Devido às suas características físicas muito favoráveis o  $^{99m}\text{Tc}$  é o radionuclídeo mais utilizado em SPECT. Actualmente, cerca de 90% dos exames são realizados com este radioisótopo que teve um papel determinante na implementação da Medicina Nuclear.

Na técnica PET, as imagens são obtidas por administração de radiofármacos que têm na sua composição radionuclídeos emissores  $\beta^+$  que, ao colidirem com os electrões da matéria, são rapidamente aniquilados, originando dois fotões  $\gamma$  antiparalelos com energia de 511 KeV. Estes fotões são detectados simultaneamente (acontecimento de coincidência) pelo detector da câmara PET o que, após tratamento adequado, permite obter imagens tridimensionais. Devido à detecção simultânea dos dois fotões antiparalelos, por intermédio de detectores múltiplos dispostos de um modo circular, a resolução espacial e a sensibilidade da técnica PET (4 - 8 mm) são superiores às da técnica SPECT (7 - 10 mm).<sup>[10]</sup>

Ao contrário do SPECT, no PET não é necessário recorrer a colimadores, uma vez que os detectores circulares, por coincidência dos fotões antiparalelos, conseguem identificar o local onde ocorreu a aniquilação (figura 1.6).



(A)



(B)

**Figura 1.6** - Vista geral de uma câmara PET (A); (B) Representação esquemática da obtenção de imagem em PET.

Alguns dos emissores de positrão ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ) que se utilizam actualmente em PET apresentam a vantagem de poderem substituir os respectivos elementos naturais nas moléculas biologicamente activas sem lhes alterar a sua actividade biológica.

No caso do  $^{18}\text{F}$ , o isótopo mais utilizado em PET, a síntese dos respectivos radiofármacos envolve usualmente a substituição de átomos de hidrogénio por flúor o que, em geral, também não altera significativamente o seu perfil biológico. A [ $^{18}\text{F}$ ]-2-fluoro-2-deoxi-D-glicose, [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, (figura 1.7) é o radiofármaco mais utilizado em PET. Tal como a glucose, a  $^{18}\text{F}$ -FDG é fosforilada pela hexocinase a 2-FDG-6-fosfato que não sofre metabolização, ficando assim retida na célula e originando a imagem dos tecidos que a retêm.<sup>[16]</sup>

A [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG tem sido útil para estudo do metabolismo do cérebro e do coração, detecção de epilepsia e diagnóstico de inúmeros tumores, entre outras aplicações.

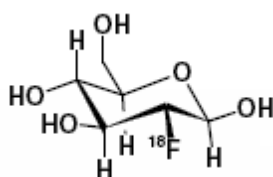


Figura 1.7 - Estrutura molecular da [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG.

Uma das desvantagens associadas à técnica PET é a necessidade de uma tecnologia onerosa e métodos de síntese automatizados e sofisticados, uma vez que os respectivos radionuclídeos são produzidos em ciclotrão e têm um período de semi-desintegração curto (2 - 110 min), o que obriga a que sejam produzidos o mais próximo possível do local onde o exame vai ser realizado.<sup>[10]</sup>

Actualmente, há um interesse crescente por emissores de positrão de elementos metálicos como o  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{85}\text{Rb}$ , uma vez que apresentam características nucleares adequadas para utilização em PET.<sup>[19]</sup> Por outro lado, o desenvolvimento de geradores para a produção de radionuclídeos emissores  $\beta^+$ , como o de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , poderá contribuir para uma maior implementação da utilização da técnica PET nos centros de medicina nuclear.

### 1.3. Química e Radioquímica do Tecnécio e do Rénio relevantes para o Desenvolvimento de Radiofármacos

#### 1.3.1. Tecnécio

##### 1.3.1.1. Aspectos Básicos

O tecnécio é um elemento químico de símbolo Tc e de número atómico 43 e foi o primeiro a ser produzido artificialmente, conhecendo-se actualmente 27 isótopos ( $^{91}\text{Tc}$  -  $^{110}\text{Tc}$ ), sete dos quais metastáveis. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é o isótopo mais relevante devido à sua importância em imagiologia médica. Este isótopo metaestável apresenta um período de semi-desintegração de, aproximadamente, seis horas e emite radiação gama monocromática com a energia de 141 keV. Estas características são consideradas ideais para a aquisição de imagens em Medicina Nuclear.<sup>[17]</sup> Para além disso, o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  pode ser obtido *in situ* pelos utilizadores, a partir do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (figura 1.8) desenvolvido em Brookhaven no início da década de 1960, o que explica a sua grande utilização e o impacto que teve na expansão da Medicina Nuclear.

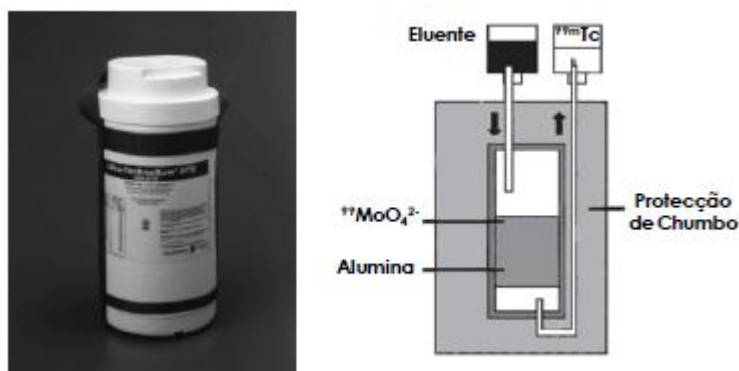


Figura 1.8 - Gerador isotópico de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

A primeira aplicação do Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) como radiofármaco foi feita sob a forma de anião pertecnetato ( $[\text{TcO}_4]^-$ ) para obtenção de imagens da tiróide, sendo que a fixação do  $[\text{TcO}_4]^-$  foi explicada pela analogia deste com o ião  $\text{I}^-$ .

Em meio aquoso, o  $\text{TcO}_4^-$  é muito estável e não reage directamente com nenhum ligando. Consequentemente, a síntese dos radiofármacos obriga à redução do  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{VII})$  a estados de oxidação inferiores. A investigação em radiofármacos tem sido realizada essencialmente com o Tc em estados de oxidação I, III, IV e V.<sup>[17]</sup>

A obtenção dos diferentes estados de oxidação é conseguida através da utilização de diferentes agentes redutores e diferentes condições reaccionais (pH, temperatura, concentração), sendo ainda condicionada pela natureza dos ligandos estabilizadores.

### 1.3.1.2. Preparação de Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$

Hoje em dia a maior parte dos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  são obtidos a partir de *kits*, que correspondem a um conjunto de reagentes de qualidade farmacêutica garantida e permitem preparar um determinado radiofármaco por reconstituição com uma solução de  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$  em NaCl 0,9% (figura 1.9), nas condições de esterilidade requeridas para administração em humanos.

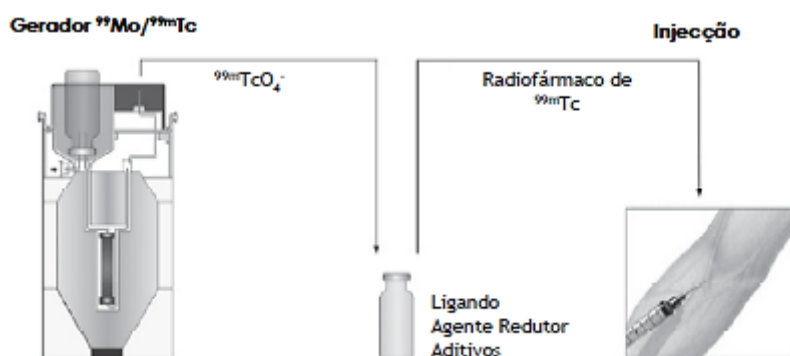


Figura 1.9 - Reconstituição de um dado kit e obtenção de um dado radiofármaco para uso clínico

As principais substâncias presentes no kit são o ligando e um agente redutor, normalmente o cloreto de estanho, podendo ainda estar presentes aditivos que permitem melhorar a eficiência de marcação e/ou a estabilidade da preparação como sejam antioxidantes, tampões, agentes solubilizantes ou excipientes.

A natureza diluída do  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4^-]$  faz com que não seja possível caracterizar os complexos pelas técnicas usuais, como difracção de raios-X, RMN ou IV. A única forma de monitorizar a formação dos complexos é recorrendo à técnica de HPLC ou de outros métodos cromatográficos (ex: electroforese ou cromatografia em camada fina), através da separação das diferentes espécies e da sua quantificação por detecção da radiação  $\gamma$  emitida. O HPLC, surge como a técnica mais adequada para a caracterização de novos complexos, no entanto, apresenta algumas limitações essencialmente devido à sua incapacidade de detectar directamente a presença de tecnécio hidrolisado ( $\text{TcO}_2$ ) ou de outras espécies coloidais. A detecção deste tipo de espécies exige a combinação com as técnicas de TLC ou ITLC.

É importante referir que o HPLC pode permitir a identificação estrutural dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , mediante comparação com complexos análogos de  $^{99}\text{Tc}$  ou de Rénio (figura 1.10), sintetizados ao nível macroscópico e caracterizados pelos métodos analíticos usuais, admitindo-se que os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re têm a mesma estrutura química se apresentarem idêntico comportamento cromatográfico quando analisados por HPLC. Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  são detectados através da emissão de radiação  $\gamma$  enquanto a detecção dos complexos de  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re é efectuada por ultravioleta-visível (UV/Vis).

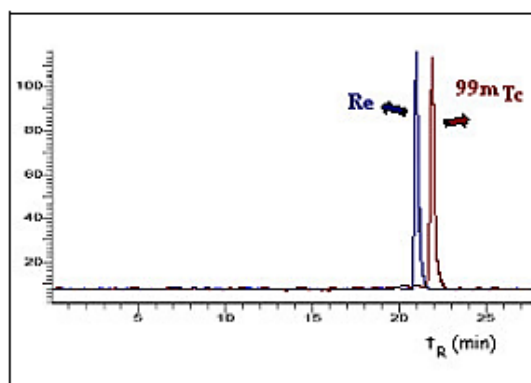


Figura 1.10 - Exemplo da comparação do comportamento cromatográfico em HPLC de complexos análogos de  $^{99m}\text{Tc}$  e de Re.

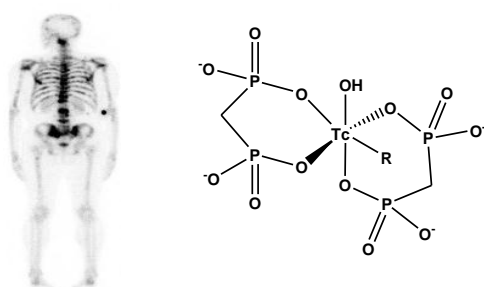
### 1.3.1.3. Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$

A imagiologia com  $^{99m}\text{Tc}$  iniciou-se com o uso de  $^{99m}\text{TcO}_4$  para visualização da tiróide. Desde então, existe uma grande variedade de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ , aprovados para uso clínico, que permitem avaliar alterações do estado funcional de diferentes órgãos (ex. coração, cérebro, rins ou fígado), bem como diagnosticar várias patologias.

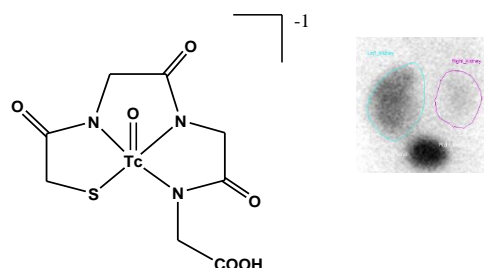
Inicialmente, o desenvolvimento dos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi efectuado sem apoio da química de coordenação do tecnécio, no entanto a partir da década de 80 do século XX tornou-se fundamental no desenvolvimento de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ .

Na figura 1.11 estão representados alguns exemplos de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  de 1ª geração aprovados para utilização clínica.

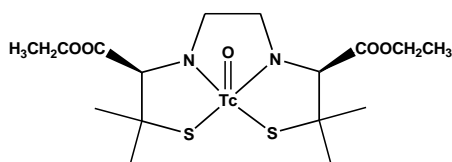
A)  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (TechneScan MDP®)



B)  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> (TechneScan MAG<sub>3</sub>®)



C)  $^{99m}\text{Tc}$ -L,L-ECD (Neurolite®)



D)  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrafosmina (Myoview®)

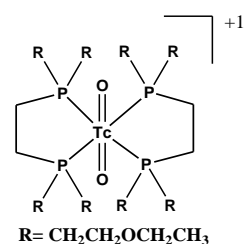


Figura 1.11 - Exemplos de radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  em uso clínico.

Os radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (MDP = metilenodifosfonato) ilustrado na figura 1.11 A (R indica a formação de misturas poliméricas), e o  $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP (HMDP = hidroximetilenodifosfonato) são utilizados como agentes de imagem óssea e fixam-se preferencialmente em locais de crescimento activo do osso (e.g. metástases e fracturas). O  $^{99m}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> (Technescan MAG<sub>3</sub>®; figura 1.11, B) é um dos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$  mais utilizado para estudos de avaliação da função renal. O  $^{99m}\text{Tc}$ -L,L-ECD (Neurolite®; figura 1.11, C) é utilizado para quantificar o fluxo sanguíneo cerebral, pois atravessa facilmente a BHE devido à sua natureza neutra e lipofílica. A  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrafosmina (Myoview®; figura 1.11, D) é um radiofármaco utilizado para estudos de perfusão do miocárdio. A fixação selectiva no miocárdio está relacionada com a natureza lipofílica e catiónica dos complexos formados.<sup>[10]</sup>

Devido ao grande desenvolvimento da biologia molecular na última década e da consequente identificação e compreensão dos mecanismos moleculares que estão na base de muitas doenças, os radiofármacos mais recentemente introduzidos no mercado e aqueles que estão em fase de avaliação pré-clínica e clínica, são radiofármacos específicos. A investigação em química radiofarmacêutica tem sido direccionada no sentido do desenvolvimento de sondas radioactivas específicas, contendo biomoléculas (anticorpos monoclonais, péptidos reguladores, agonistas ou antagonistas de receptores específicos, etc), capazes de reconhecer *in vivo* alvos moleculares (receptores celulares, proteínas, enzimas, hormonas, etc) sobre ou sub-expressos em diferentes estados patológicos. A elevada afinidade e especificidade conseguida para estes alvos moleculares *in vivo* poderá levar a um aumento da sensibilidade das técnicas de imagiologia nuclear, permitindo a detecção e visualização dos processos bioquímicos que antecedem as alterações morfológicas, e assim, a detecção precoce de certas doenças.<sup>[15, 20-23]</sup>

Na figura 1.12, apresentam-se as estruturas dos radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -Depreótido (NeoTect®) e  $^{99m}\text{Tc}$ -Apcitide (Acutec®) em utilização clínica. O  $^{99m}\text{Tc}$ -Depreótido (NeoTect®) permite detectar massas tumorais pulmonares que expressam receptores da somatostatina enquanto que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Apcitide (Acutec®) permite a visualização das trombozes venosas agudas nas extremidades inferiores.

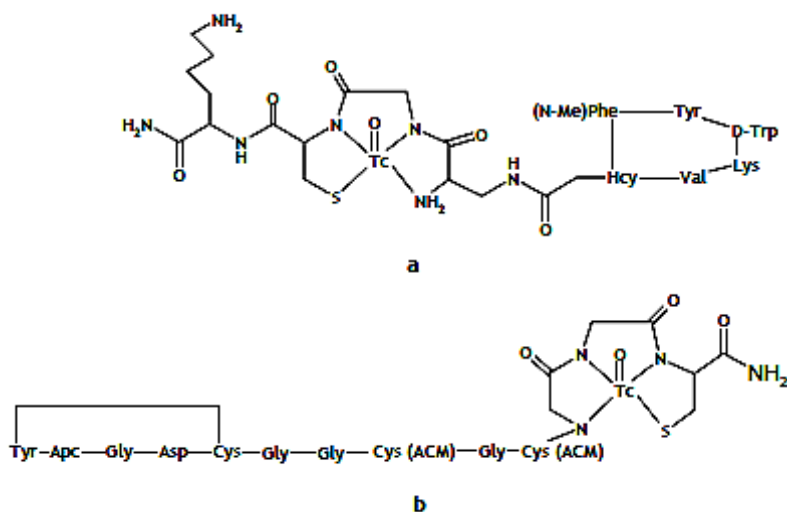
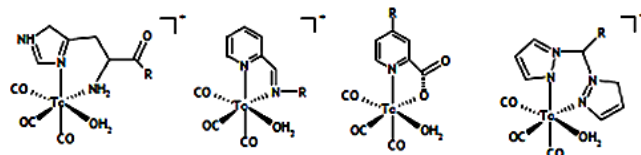


Figura 1.12 - Estrutura dos radiofármacos específicos  $^{99m}\text{Tc}$ -Apcitide (a) e  $^{99m}\text{Tc}$ -Depreótido (b) e em utilização clínica

De entre as metodologias mais recentemente introduzidas para o desenvolvimento de novos radiofármacos específicos de  $^{99m}\text{Tc}$ , a aproximação organometálica baseada em complexos com a unidade  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , obtida a partir do precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , tem sido uma das mais promissoras. Devido à configuração electrónica  $d^6$  do metal, esta unidade apresenta uma elevada estabilidade cinética em relação à substituição total ou parcial dos ligandos CO, o que lhe confere elevada resistência. Também a estabilidade à oxidação, demonstrada numa vasta gama de pH em solução aquosa, constitui outra vantagem adicional da unidade  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ . Para além disso, no precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  os três ligandos carbonilo fortemente ligados ao centro metálico, labilizam as três moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  em posição trans, possibilitando a sua substituição por uma grande variedade de agentes quelantes.<sup>[19, 21]</sup>

Assim, o facto da unidade  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  apresentar dimensões reduzidas, geometria quase esférica, formando em geral complexos octaédricos com elevada estabilidade cinética e termodinâmica, potencia a sua utilização no desenho de radiofármacos utilizando ligandos unidentados, bidentados e tridentados, com uma grande diversidade de átomos doadores (ex: P, S, N, O, C, H) e facilmente funcionalizáveis com biomoléculas (figura 1.13).<sup>[41]</sup>

#### Complexos com Ligandos Bidentados



#### Complexos com Ligandos Tridentados

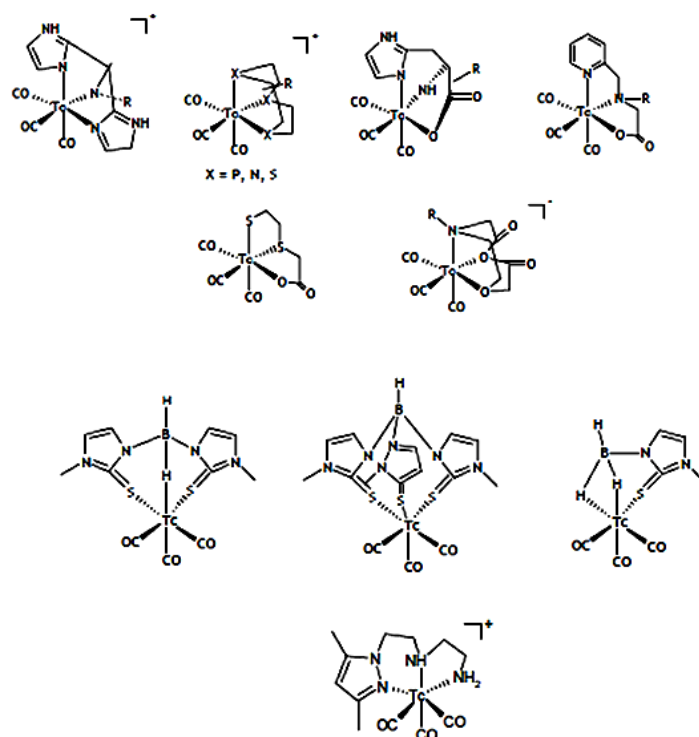


Figura 1.13 - Exemplos de complexos com a unidade  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$

### 1.3.2. Rénio

1

H

3

Li

4

Be

11

Na

12

Mg

19

K

20

Ca

21

Sc

22

Ti

23

V

24

Cr

25

Mn

26

Fe

27

Co

28

Ni

29

Cu

30

Zn

37

Rb

38

Sr

39

Y

40

Zr

41

Nb

42

Mo

43

Tc

44

Ru

45

Rh

46

Pd

47

Ag

48

Cd

55

Cs

56

Ba

\*

72

Hf

73

Ta

74

W

75

Re

76

Os

77

Ir

78

Pt

79

Au

80

Hg

87

Fr

88

Ra

\*\*

104

Rf

105

Db

106

Sg

107

Bh

108

Hs

109

Mt

110

Uun

111

Uuu

112

Uub

57

La

58

Ce

59

Pr

60

Nd

61

Pm

62

Sm

63

Eu

64

Gd

65

Tb

66

Dy

67

Ho

68

Er

69

Tm

70

Yb

71

Lu

89

Ac

90

Th

91

Pa

92

U

93

Np

94

Pu

95

Am

96

Cm

97

Bk

98

Cf

99

Es

100

Fm

101

Md

102

No

103

Lr

2

He

5

B

6

C

7

N

8

O

9

F

10

Ne

13

Al

14

Si

15

P

16

S

17

Cl

18

Ar

31

Ga

32

Ge

33

As

34

Se

35

Br

36

Kr

49

In

50

Sn

51

Sb

52

Te

53

I

54

Xe

81

Tl

82

Pb

83

Bi

84

Po

85

At

86

Rn

24

Cr

25

Mn

26

Fe

42

Mo

43

Tc

44

Ru

74

W

75

Re

76

Os

106

Sg

107

Bh

108

Hs

**Figura 1.14** - Tabela Periódica - Ampliação de uma fracção do bloco dos metais de transição, onde se observa o Tc e o Re, no grupo VII.

O Rénio é um dos elementos mais raros que ocorrem naturalmente, surgindo como uma mistura de dois isótopos, o  $^{185}\text{Re}$  (37,4%) e o  $^{187}\text{Re}$  (62,6%). Os isótopos radioactivos  $^{186}\text{Re}$  e o  $^{188}\text{Re}$  são adequados para uso terapêutico em Medicina Nuclear, pois são emissores  $\beta^-$  com tempos de semi-vida de 90 h e 17 h, respectivamente. Tanto o  $^{186}\text{Re}$  como o  $^{188}\text{Re}$  emitem radiação  $\gamma$ , o que permite seguir *in vivo* a biodistribuição dos seus complexos.

Devido à contracção dos lantanídeos, o Tc e Re apresentam raios atómicos praticamente coincidentes (1,35 e 1,37 ppm, respectivamente) e, por essa razão, os seus complexos são muito similares em termos de características físicas e comportamento químico. A semelhança química entre o Re e Tc faz com que os seus complexos tenham também características físicas similares. Como já foi referido anteriormente, esta similaridade é importante no contexto da Medicina Nuclear pois permite que os complexos de Re sejam usados como modelo na identificação dos complexos análogos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>[8]</sup>

As principais diferenças entre o comportamento químico dos complexos de Re e Tc surgem a nível das propriedades redox e da cinética das reacções de substituição. Os complexos de Re são mais fáceis de oxidar e mais difíceis de reduzir, e portanto são cineticamente mais inertes que os complexos análogos de Tc.

De acordo com os conhecimentos adquiridos no âmbito da química radiofarmacêutica do Tc poderia pensar-se que estes seriam facilmente transferidos para o desenvolvimento de radiofármacos de  $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ , no entanto, essa transferência não é linear devido essencialmente à maior tendência dos complexos de Re para sofrer processos de reoxidação. Devido a estas dificuldades, o  $^{188}\text{Re}$ -HEDP, um disfosfonato utilizado como paliativo da dor óssea mas cuja estrutura química não é conhecida, é o único radiofármaco de Re, até à data, que se encontra em estudos clínicos avançados.<sup>[23]</sup>



## 1.4. Processo de Metastização Óssea

A probabilidade de formação de metástases ósseas, após o aparecimento de um tumor primário maligno, depende do tipo de tumor diagnosticado. Os pacientes com Mieloma são os que apresentam uma maior percentagem de maior incidência de metástases ósseas (70 - 95%), enquanto que pacientes com tumores primários incidente no rim ou ainda pacientes com melanoma apresentam metástases ósseas com uma percentagem de incidência mais reduzida (20 - 25% e 14 - 45% , respectivamente).<sup>[25]</sup>

A metastização óssea provoca o enfraquecimento sucessivo do osso e origina um conjunto de patologias, de entre as quais a dor óssea, fracturas, hipercalcémia e compressão da espinal medula, sendo a dor óssea o primeiro sinal de metastização.

Cada um dos passos do processo metastático oferece potenciais pontos de intervenção terapêutica para reverter ou prevenir o desenvolvimento metástases ósseas. A figura 1.15 ilustra, a título de exemplo, as várias etapas do processo de metastização óssea no cancro de mama: a) no tumor primário, as células do tumor (a verde) e do estroma local (a castanho) interagem por meio de uma variedade de mecanismos para aumentar a migração de células do tumor e entrar na circulação sistémica; b) uma vez presentes nos vasos sanguíneos, as células tumorais interagem com células do hospedeiro residente, tais como eritrócitos, células T e neutrófilos e plaquetas sanguíneas, que facilitam a sua sobrevivência na circulação; c) Na medula óssea, as células tumorais são capazes de sair do sistema vascular (extravasão) onde interagem com as células do tecido ósseo, como os osteoclastos (a vermelho), formando-se a metástase óssea.<sup>[26]</sup>

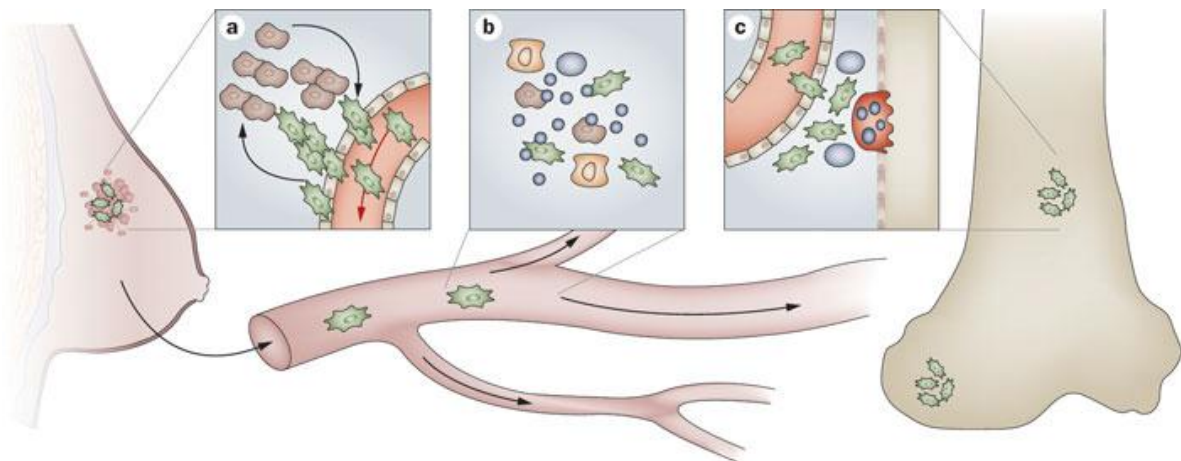


Figura 1.15 - Processo de Metastização<sup>[26]</sup>

### 1.4.1. Tratamento Paliativo de Metástases Ósseas

De forma a aumentar a sobrevivência dos pacientes com metástases ósseas e proporcionando-lhes uma melhor qualidade de vida, nomeadamente pelo alívio da dor óssea e prevenindo a probabilidade de ocorrência de fracturas patológicas, conservando deste modo a mobilidade, tem-se procurado métodos terapêuticos de forma a tratar as metástases ósseas.

De acordo com a avaliação clínica de cada um dos pacientes, o tratamento de metástases ósseas pode ser local ou sistémico. No caso de um tratamento local este é feito recorrendo à radioterapia ou através de cirurgia, enquanto que num tratamento sistémico utilizam-se analgésicos, radiofármacos ou bisfosfonatos (BP) e terapias como a hormonoterapia ou a quimioterapia.<sup>[17, 27-29]</sup>

A utilização de analgésicos e anti-inflamatórios é recomendada como primeira abordagem pela Organização Mundial de Saúde sendo utilizada rotineiramente no combate à dor, no entanto, a utilização de analgésicos origina efeitos secundários, que podem ser mais graves do que a própria dor óssea.<sup>[30]</sup> Radionuclídeos como o  $^{32}\text{P}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{166}\text{Ho}$ , são considerados como úteis no tratamento paliativos da dor óssea. Assim, devido às características intrínsecas destes mesmos radionuclídeos, todos os radiofármacos para tratamento paliativo da dor óssea utilizados são emissores  $\beta^-$ .<sup>[42]</sup>

A afinidade natural para o osso metabolicamente activo com actividade osteoblástica elevada do Fósforo-32 ( $\text{Na}_3^{32}\text{PO}_4$ ) e do Estrôncio-89 ( $^{89}\text{SrCl}_2$ ) permitiu que estes pudessem ser incorporados na Hidroxiapatite (HA) após injeção intravenosa, tornando-se nos primeiros compostos aprovados para o tratamento paliativo da dor óssea. A utilização clínica do  $^{32}\text{P}$  diminuiu consideravelmente desde os anos 80 devido a várias limitações. Assim, desde então têm sido mais utilizados o  $^{89}\text{Sr}$  ( $^{89}\text{SrCl}_2$ ),  $^{153}\text{Sm}$  ( $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ ),  $^{186}\text{Re}$  ( $^{186}\text{Re-HEDP}$ ) e  $^{188}\text{Re}$  ( $^{188}\text{Re-HEDP}$ ).<sup>[28]</sup>

Ao contrário do  $^{32}\text{P}$  e do  $^{89}\text{Sr}$ , os restantes radioisótopos são utilizados após coordenação a ligandos polidentados contendo grupos fosfonato, que lhes conferem afinidade para o osso.

### 1.4.2. Mecanismo de Acção dos Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BPs) estabeleceram-se como uma nova e eficaz classe de fármacos para o tratamento de patologias metabólicas benignas ou malignas do sistema osteo-articular.

A acção *in vivo* desta classe de compostos deve-se à sua forte afinidade para ligação à hidroxiapatite (HA), que é o principal componente da matriz inorgânica do osso (69 %). Essa elevada afinidade é explicada pela possibilidade que têm para se coordenar aos iões  $\text{Ca}^{2+}$ , através dos oxigénios desprotonados das unidades fosfonato. Esta fixação é mais significativa em zonas metabolicamente activas da matriz óssea o que permite a visualização de locais de elevada remodelação óssea.<sup>[47]</sup>

Como se pode ver na figura 1.16, a ligação entre os dois grupos fosfato é feita através de um átomo de carbono (P - C - P), o que torna os BPs resistentes à degradação enzimática *in vivo*, e por isso adequados para utilização clínica. No entanto, de modo a potenciar a sua acção como agentes de anti-reabsorção óssea, têm sido introduzidas várias alterações na sua estrutura química (figura 1.16).

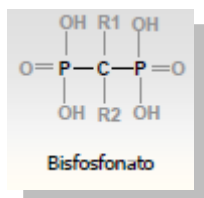


Figura 1.16 - Estrutura geral dos bisfosfonatos (R1 = H ou OH, R2 = grupo substituinte que interfere na sua acção biológica)

Na figura 1.17 apresentam-se as estruturas químicas dos diferentes BPs sintetizados e reconhecidos, até aos dias de hoje.<sup>[36]</sup>

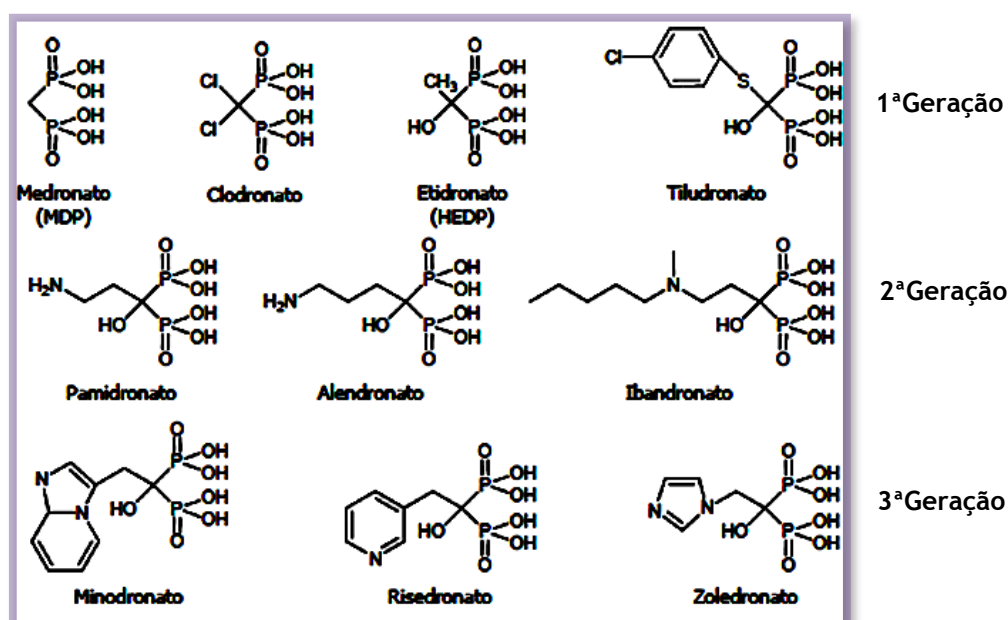


Figura 1.17 - Estrutura química de bisfosfonatos.

Os primeiros bisfosfonatos a serem estudados foram o medronato, clodronato, etidronato e o tiludronato, sendo designados de BPs de 1ª geração.

As modificações estruturais introduzidas demonstraram que a afinidade dos BPs para a hidroxiapatite (HA) aumenta quando R1 = OH, o que se deve provavelmente à coordenação tridentada dos BPs aos iões  $\text{Ca}^{2+}$  da Hidroxiapatite, daí que, os BPs das gerações seguintes possuam todos um grupo hidroxilo. A natureza do grupo R2 (figura 1.17) é determinante para a potência dos bisfosfonatos enquanto inibidores da reabsorção óssea, daí que este grupo tenha vindo a ser modificado.<sup>[36-38]</sup> A introdução de um grupo funcional amina na cadeia R2 permitiu obter bisfosfonatos 10 a 100 vezes mais potentes que os da 1ª geração. O Alendronato (ALN) e o Pamidronato (PAM) inserem-se neste grupo de compostos usualmente designados de

aminobisfosfonatos. Posteriormente, a presença de amins cíclicas na estrutura dos bisfosfonatos conduziu a compostos de 3ª geração, ainda mais potentes (ex: Risedronato e Zoledronato).

A estrutura óssea está sujeita a uma constante renovação. Embora muitos pensem que não têm actividade, os ossos são formados por uma substância viva e passam por um constante processo de renovação, já que os sectores do osso mais velho vão sendo continuamente substituídos por osso novo. Este processo, denominado renovação óssea, embora vá ficando cada vez mais comprometido com o passar dos anos, persiste durante toda a vida.<sup>[39]</sup>

A renovação do osso é provocada por uma acção sequencial dos diferentes tipos de células ósseas, os *osteoblastos*, responsáveis pela formação de osso novo, e os *osteoclastos*, que se encarregam da destruição do osso envelhecido. Na etapa inicial do processo, os osteoclastos começam por reabsorver o osso nos diversos pontos em que o tecido já está envelhecido, deixando pequenos sectores "ocos". Em seguida, estas cavidades são ocupadas pelos osteoblastos, que deverão produzir osso novo. O processo de renovação ocorre ciclicamente, de forma ininterrupta e simultânea nos inúmeros focos de cada osso. O equilíbrio dinâmico entre a reabsorção e a formação óssea mediada pelos osteoclastos e pelos osteoblastos, respectivamente, é a base fisiológica da remodelação do osso, que é regulada por um sistema complexo de factores locais e sistémicos. A perturbação deste equilíbrio origina patologias metabólicas benignas e malignas osteo-articulares, como por exemplo a osteoporose, a doença de Paget, o tumor ósseo e outras doenças associadas à destruição do osso. A acção dos BPs reduz este problema inibindo a actividade dos osteoclastos.<sup>[39,40]</sup>

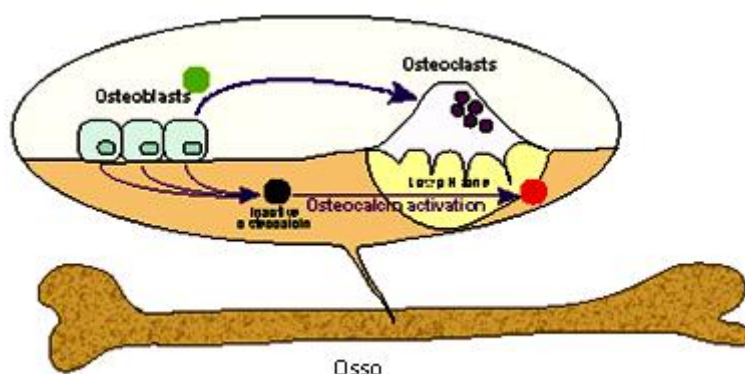


Figura 1.18 - Processo de renovação óssea promovido pela acção dos osteoblastos e osteoclastos.

A utilização de BPs como transportadores de radiação  $\beta^-$  também tem sido aplicada com sucesso na preparação de radiofármacos para tratamento paliativo da dor óssea. Encontram-se actualmente em utilização clínica alguns compostos, como por exemplo o  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$  (EDTMP: ácido etilenodiaminatetrametilenofosfonico), o  $^{186}\text{Re-HEDP}$  e o  $^{188}\text{Re-HEDP}$ .<sup>[42, 46]</sup>

Recentemente, os BPs têm sido considerados bons veículos para diferentes tipos de fármacos que, após conjugação à unidade bisfosfonato, têm sido utilizados para tratamento específico de patologias osteo-articulares, como a osteoporose, a osteoartrite, infecções crónicas e tumor ósseo.<sup>[30, 31, 33, 35]</sup>

## 1.5. Complexos de $^{99m}\text{Tc}$ e $^{186/188}\text{Re}$ para Visualização e/ou Terapia de Metástases Ósseas

Actualmente, o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e o  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP são os dois radiofármacos, em utilização clínica para o diagnóstico de metástases ósseas, no entanto, apesar do seu sucesso eles apresentam várias limitações como sejam o elevado tempo de espera até à aquisição da imagem e a falta de especificidade para determinadas doenças o que pode conduzir a falsos negativos. Por outro lado, os grupos fosfonato são utilizados para estabilizar o metal e para se ligarem ao osso o que pode diminuir a captação óssea, formam uma mistura de espécies radioquímicas que varia ao longo do tempo e que apresentam diferentes propriedades biológicas e a sua verdadeira estrutura química é desconhecida.<sup>[44, 45]</sup> Uma outra desvantagem relacionada com o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP é o facto dos BPs serem ligandos fracos, pelo que estes complexos oxidam-se *in vivo*, regenerando  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ , o que contribui para uma diminuição da fixação óssea e para um aumento da dose acumulada nos tecidos moles<sup>[48]</sup>.

Para a terapia paliativa da dor óssea, foram também preparados bisfosfonatos marcados com  $^{186/188}\text{Re}$ . O  $^{186}\text{Re}$ -HEDP já foi aprovado em alguns países da Europa enquanto que o  $^{188}\text{Re}$ -HEDP se encontra apenas em ensaios clínicos. Nestes radiofármacos a probabilidade de ocorrência de reoxidação a  $[\text{}^{186/188}\text{ReO}_4]^-$  é superior.

Assim, no sentido de ultrapassar algumas das desvantagens do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP,  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP e  $^{186/188}\text{Re}$ -HEDP, vários investigadores têm tentado conceber novos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  e  $^{188/186}\text{Re}$  contendo bisfosfonatos para diagnóstico e/ou terapia de metástases ósseas.<sup>[48]</sup>

Uma das estratégias mais exploradas tem sido a utilização de ligandos bifuncionais, vectorizados com bisfosfonatos. Estes ligandos permitem estabilizar o metal e deixar o bisfosfonato disponível para se ligar ao osso. Com esta metodologia, seria de esperar que fossem obtidos complexos com uma estrutura bem definida e com elevada afinidade para o osso.

A figura 1.19 mostra alguns dos oxo-complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  e  $^{186}\text{Re}$ , que foram sintetizados e avaliados para detecção e/ou terapia de metástases ósseas.

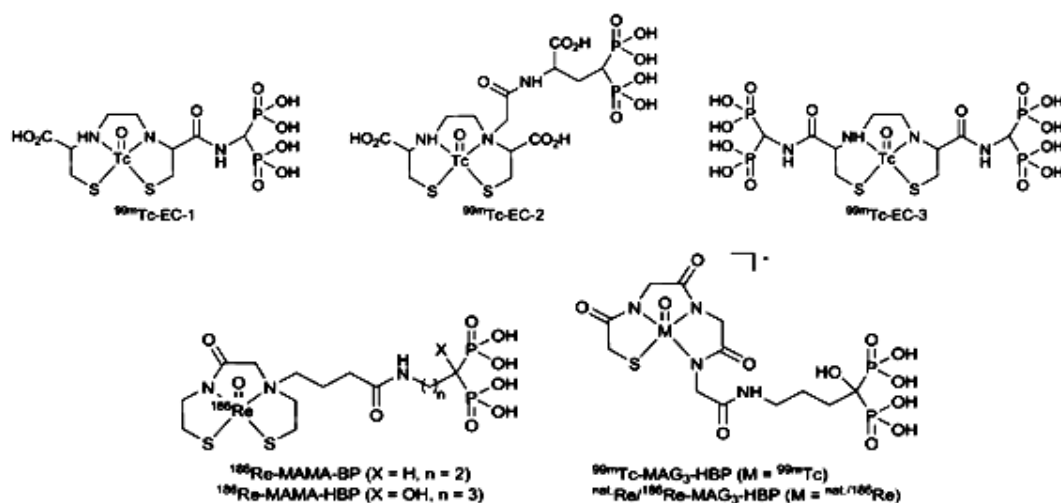


Figura 1.19 - Exemplos de oxo-complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ , e  $\text{Re}$ .<sup>[36]</sup>

A aproximação organometálica baseada em complexos com a unidade  $fac-[M(CO)_3]^+$  ( $M = {}^{99m}Tc, {}^{188}Re$ ) também tem sido explorada para o desenvolvimento de sondas radioactivas contendo BPs (figura 1.20).

Blower P.J. e alguns colaboradores estudaram os complexos  $M$ -dpa-ALN ( $M = {}^{99m}Tc, {}^{188}Re$  e  $Re$ ) (figura 1.20 B). Estes complexos foram sintetizados por reacção dos precursores  $fac-[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$  ( $M = {}^{188}Re, {}^{99m}Tc, Re$ ) com dpa-ALN, sendo isolados como espécies únicas e bem definidas, com elevado rendimentos e pureza radioquímica.<sup>[44, 49]</sup> A fixação óssea de  ${}^{99m}Tc$ -dpa-ALN (27 % A.I./g osso) é comparável à do  ${}^{99m}Tc$ -MDP (30 % A.I./g osso) e o complexo  ${}^{188}Re$ -dpa-ALN ( $21,2 \pm 6,6$  % A.I./g osso) apresenta uma acumulação óssea superior à do  ${}^{188}Re$ -HEDP ( $13,4 \pm 0,2$  % A.I./g osso). Para além disso, ambos os complexos apresentam uma acumulação reduzida nos tecidos moles, sofrendo acumulação preferencial nos locais do osso com elevada actividade metabólica.

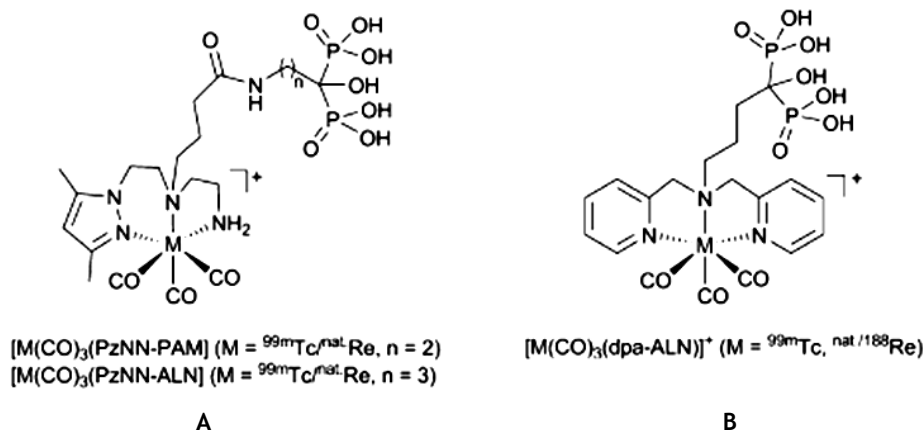


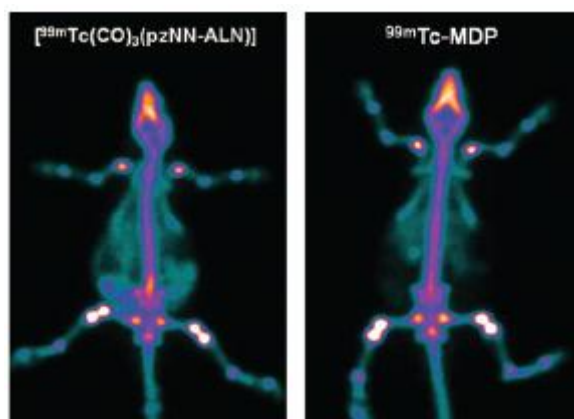
Figura 1.20 - Complexos de Tc(I) e Re (I) contendo um bisfosfonato. <sup>[36]</sup>

Santos e colaboradores sintetizaram novos complexos, de entre os quais o complexo  $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$  (figura 1.20 A) com elevado potencial como radiofármaco para imagiologia óssea.

Os estudos de adsorção deste complexo à HA *in vitro*, permitiram concluir que a capacidade osteotrópica do complexo  $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$  era semelhante à do  ${}^{99m}Tc$ -MDP estudado nas mesmas condições. Para além disso, o complexo  $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$  apresentou um bom perfil biológico em termos de fixação óssea, eliminação e razões osso/órgão não alvo, elevada estabilidade e resistência à metabolização *in vivo*. Além disso, não sofre retenção significativa no estômago, indicando que não ocorreu, a dissociação do  ${}^{99m}Tc$  do ligando pirazolo, com reoxidação a  $[{}^{99m}TcO_4]^-$ .<sup>[43]</sup>

O valor da razão osso/músculo em ratinhos *Balb-c* para  $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$  foi significativamente superior às 4h *p.i.* ( $79,0 \pm 2,9$ ) à do  ${}^{99m}Tc$ -MDP ( $47,9 \pm 13,6$ ) enquanto que as razões osso/sangue se mantiveram próximas. O valor de excreção total da actividade injectada também foi superior para  $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$  comparativamente ao  ${}^{99m}Tc$ -MDP, principalmente às 4h *p.i.* ( $[{}^{99m}Tc(CO)_3(pzNN-ALN)]$ :  $77,2 \pm 0,5$  e  ${}^{99m}Tc$ -MDP:  $56,8 \pm 0,9$ ).

Na figura 1.21 estão representadas as imagens obtidas 2h após administração do complexo  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{pzNN-ALN})]$  e do  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  em ratos Sprague Dawley, confirmando deste modo o seu potencial como radiofármacos por imagem óssea.



**Figura 1.21-** Imagem de corpo inteiro de rato Sprague Dawley, 2 h após injeção de  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{pzNN-ALN})]$  e  $^{99m}\text{Tc-MDP}$ , obtidas em câmara-gama (adaptado de [36]).

## 1.6. Objectivos do trabalho

O trabalho apresentado nesta tese tinha como principal objectivo explorar a química, radioquímica e o comportamento biológico, incluindo a afinidade para o osso, de novos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  contendo bisfosfonatos. Pretendíamos também sintetizar complexos análogos de Rénio  $^{186}\text{Re}$  ou de  $^{188}\text{Re}$ . Estes complexos seriam constituídos por uma unidade BP, que conferia afinidade para o osso e um elemento radioactivo emissor de radiação ionizante ( $\beta^-$ ) com capacidade para destruir células cancerígenas, esperando-se um efeito citotóxico sinérgico.

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos. No primeiro capítulo faz-se uma breve introdução à Medicina Nuclear e à sua aplicação na área da Imagiologia e terapia óssea. Para além disso, ainda no capítulo 1, faz-se uma pequena abordagem ao cancro e às diversas modalidades terapêuticas, destacando a metastização óssea e o seu tratamento paliativo. Discute-se o mecanismo de acção dos bisfosfonatos e apresentam-se os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  e  $^{186/188}\text{Re}$  mais promissores para visualização e tratamento de metástases ósseas.

No capítulo 2 apresentamos a síntese e caracterização de novos ligandos contendo um grupo bisfosfonato bem como dos respectivos complexos de Re e  $^{99m}\text{Tc}$ . Para além disso, apresenta-se o comportamento biológico do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3).

No capítulo 3 apresentam-se as conclusões finais bem como algumas sugestões para a continuação do trabalho iniciado nesta dissertação. Por fim, no capítulo 4 encontra-se toda a informação experimental relativa ao trabalho apresentado no capítulo 2.





## Capítulo 2

# SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS CONTENDO UM GRUPO BISFOSFANATO



## 2. Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Compostos contendo um grupo Bisfosfonato

### 2.1. Considerações Gerais

Como referido anteriormente, bisfosfonatos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP) têm sido utilizados para o diagnóstico de metástases ósseas e estadiamento da doença. Uma das vantagens desta técnica de imagem reside na sua elevada sensibilidade o que permite a detecção das metástases ósseas numa fase muito precoce da metastização. Por outro lado, bisfosfonatos marcados com  $^{186/188}\text{Re}$  ( $^{186}\text{Re}$ -HEDP e  $^{188}\text{Re}$ -HEDP) estão indicados para a terapia paliativa da dor óssea.

Contudo, os fosfonatos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  em utilização clínica consistem numa mistura de espécies e o estado de oxidação do metal nestes complexos não está completamente definido. Além disso, os grupos fosfonato para além de promoverem a coordenação ao  $\text{Ca}^{2+}$  da HA são também utilizados para a estabilização do metal o que pode comprometer a fixação óssea. Para ultrapassar estas desvantagens, têm sido desenvolvidas sondas radioactivas de  $^{99m}\text{Tc}$  em que o metal se encontra estabilizado por um ligando bifuncional vectorizado com bisfosfonatos que ficam disponíveis para se ligarem ao  $\text{Ca}^{2+}$  da HA aumentando a fixação óssea.

A carga, peso molecular e lipofilia são propriedades físico-químicas que podem ser determinantes para a capacidade dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  atingirem o osso, um requisito essencial para a sua aplicação como sondas radioactivas para detecção *in vivo* de metástases ósseas. Na expectativa de otimizar estas características físico-químicas e para obviar alguns dos problemas dos grupos fosfonatos, o trabalho proposto para esta dissertação consistia em preparar ligandos bifuncionais cuja função era a estabilização do metal e a ligação deste a grupos funcionais com afinidade para o osso. Os ligandos bifuncionais a estudar eram do tipo pirazolo-amina-pirazolo, pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxilato, potencialmente tridentados e apresentando como característica comum a presença de um anel de pirazolilo como função coordenante. Estes ligandos bifuncionais seriam utilizados para preparar os respectivos complexos tricarbonilo de  $\text{Re(I)}$  e  $^{99m}\text{Tc(I)}$  funcionalizados com o Alendronato (figura 2.1).

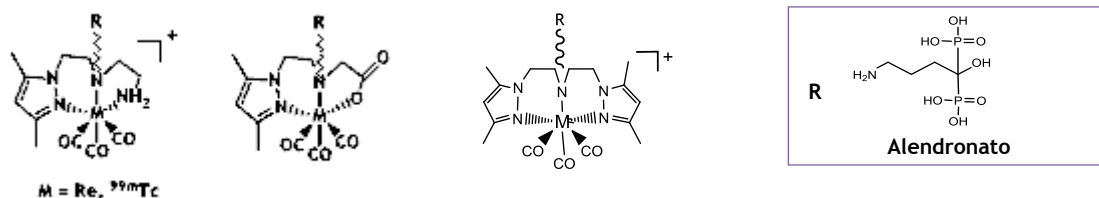
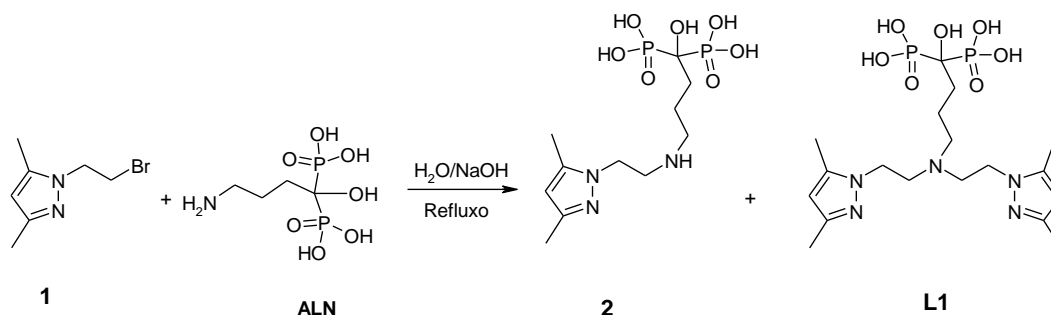


Figura 2.1 - Estrutura dos complexos de  $\text{Re}/^{99m}\text{Tc}$  com ligandos do tipo pirazolo-diamina ou do tipo pirazolo-aminocarboxilato que se pretendiam funcionalizar com um bisfosfonato (Alendronato) com afinidade para o osso.

## 2.2. Síntese e Caracterização de Ligandos Bifuncionais contendo grupos bisfosfonatos

### 2.2.1. Síntese e caracterização do Ligando L<sup>1</sup>



Esquema 2.1 - Síntese de L<sup>1</sup> e do composto 2

Para sintetizar os ligandos funcionalizados com um grupo aminobisfosfonato começámos por preparar o alendronato (ALN), de acordo com o procedimento descrito por Kieczkowski [50]. Resumidamente, a uma mistura de ácido 4-aminobutírico, ácido metanosulfónico e H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> a 65°C adicionou-se lentamente PCl<sub>3</sub> e manteve-se o aquecimento e agitação durante a noite. Após arrefecimento da mistura reaccional, adicionou-se água fria e refluxou-se durante 5 h. Em seguida, ajustou-se o pH a 4-5, colocou-se a mistura no congelador, e o alendronato precipitou sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 87%. Depois de filtrado e seco foi analisado por espectroscopia de RMN multinuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e <sup>31</sup>P. O composto obtido foi formulado como um sal, (4-amino-1-hidroxibutilideno)bisfosfonato de trisódio tetrahidratado, com base na análise elementar.

O composto 1 foi obtido por reacção de 3,5-dimetilpirazolo com excesso de 1,2-dibromoetano, em presença de NaOH e usando brometo de tetrabutilamónio (TBAB) como catalisador de transferência de fase, de acordo com o descrito na secção 4.4.1.1.

A estratégia de síntese delineada para preparar os diferentes ligandos vectorizados com o alendronato, envolvia uma reacção de N-alquilação da função amina do bisfosfonato com o composto N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (1), como se apresenta no esquema 2.1. Esta metodologia tinha a vantagem de ser expedita, no entanto, enfrentava dois obstáculos: 1) a falta de solubilidade do alendronato em solventes orgânicos, o que dificulta a reacção de conjugação; 2) a elevada basicidade do grupo amina do alendronato (pK<sub>a</sub> 12,7) o que dificulta o ataque nucleofílico utilizando bases orgânicas comuns. De facto, foi impossível obter o ligando L<sup>1</sup> quando a reacção decorreu na presença de trietilamina ou DIPEA, mesmo a temperaturas elevadas. Optou-se por efectuar a alquilação da amina primária do ALN em meio aquoso (para solubilizar o bisfosfonato) usando uma base inorgânica forte (NaOH) e mantendo o pH a ~12. No entanto, quando a reacção decorreu à temperatura ambiente não se observou a formação do composto pretendido. Colocando a mistura reaccional à temperatura de refluxo, observou-se a formação do composto pretendido 2 e do ligando pretendido L<sup>1</sup>, por bis-alquilação da amina primária do alendronato.

Estes dois compostos ( $L^1$  e **2**) podem ser separados e purificados por cromatografia em coluna Sep-Pack<sup>®</sup> C18, usando como eluentes um gradiente de  $H_2O/MeOH$ , pelo que foi possível obter os dois compostos  $L^1$  e **2** quimicamente puros numa só reacção. Foi ainda possível otimizar as condições reaccionais de modo a maximizar a formação de um ou de outro, modificando a estequiometria e o tempo de reacção. O progresso da reacção foi seguido por HPLC.

A formação do ligando  $L^1$  é favorecida quando se utiliza um excesso de N-(2-bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (5,8 equivalentes) e se aumenta o tempo de reacção (4 dias). Nestas condições, o ligando  $L^1$  foi obtido puro, sob a forma de um pó branco, com um rendimento de 60% após purificação por coluna Sep-Pack<sup>®</sup> C18.

Para favorecer a formação do composto **2** fez-se reagir o ALN com o composto **1** (1/1), sob refluxo, mantendo o pH a cerca de 12, durante 2 dias. Nestas condições, **2** foi obtido puro, sob a forma de um sólido branco, com um rendimento de 32% após purificação por coluna Sep-Pack<sup>®</sup> C18.

O composto intermediário **2** e o ligando  $L^1$  foram caracterizados por espectroscopia de RMN multinuclear ( $^1H$ ,  $^{13}C$  e  $^{31}P$ ), espectroscopia de IV, espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e HPLC. Foram também caracterizados por análise elementar C, H, N.

Relativamente à análise elementar, os valores encontrados eram concordantes com as formulações propostas para o composto **2** e para o ligando  $L^1$ . O resultado da análise elementar, e os dados obtidos através das análises espectroscópicas bem como a análise de espectrometria de massa, permitiram caracterizar de forma inequívoca os dois compostos sintetizados.

Como o ligando  $L^1$  é simétrico, o seu espectro de RMN de  $^1H$  é relativamente simples. Nas figuras 2.2 e 2.3 apresentam-se os espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  do composto  $L^1$  e na figura 2.4 apresentam-se os espectros de  $^1H$  e de  $^{31}P$  do composto **2**.

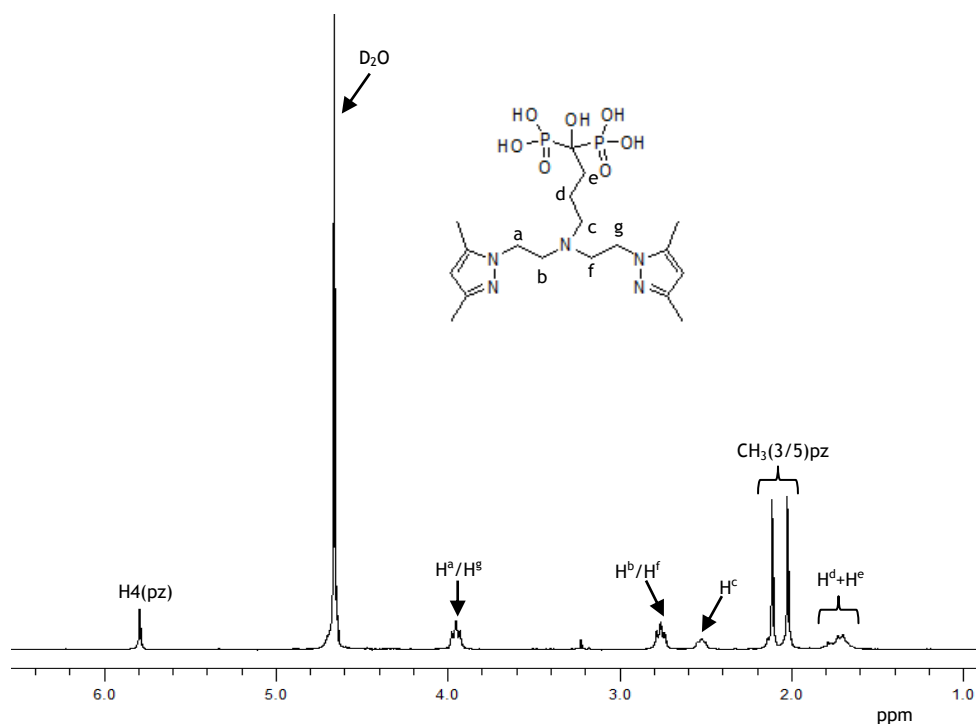


Figura 2.2 - Espectro de RMN de  $^1H$  para o composto  $L^1$  em  $D_2O$ .

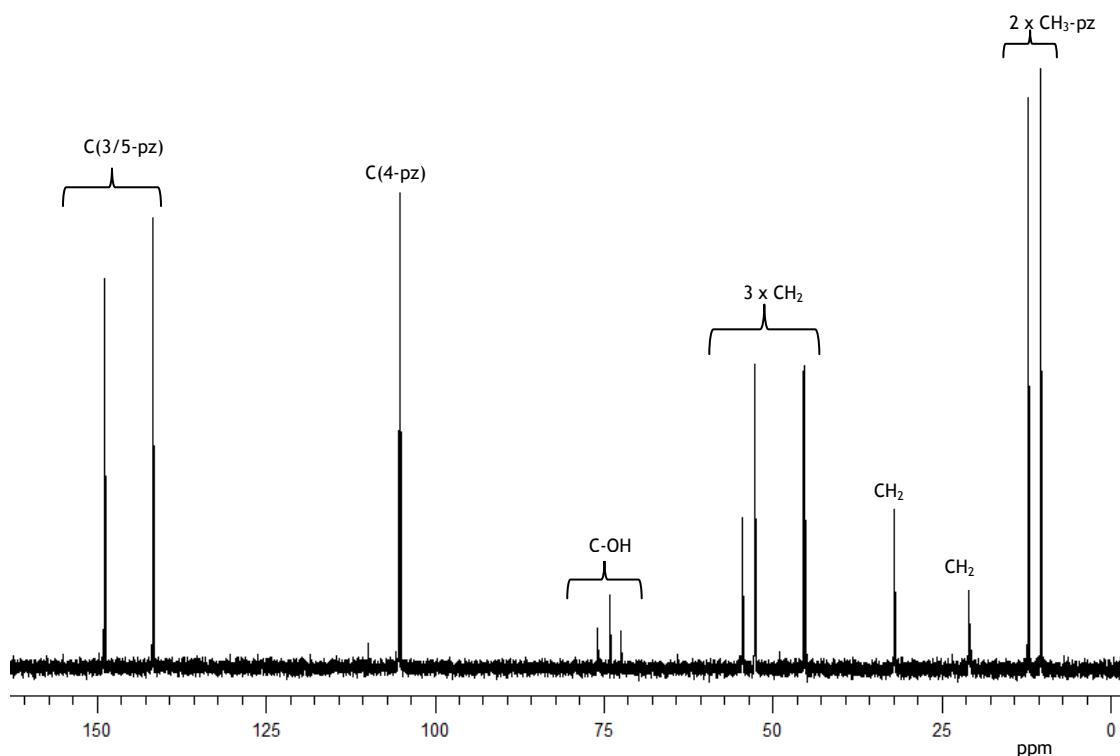


Figura 2.3 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto  $\text{L}^1$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Devido ao carácter simétrico do ligando  $\text{L}^1$  o seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é muito semelhante ao do composto **2**. Como os dois anéis pirazólico de  $\text{L}^1$  são equivalentes, observa-se em ambos os espectros, um único singuleto atribuído aos protões H(4) (5,78 ppm para  $\text{L}^1$ ; 5,82 ppm para **2**) que integram para dois protões em  $\text{L}^1$  e apenas para um protão no composto **2**. Os quatro grupos metilo dos anéis pirazolo de  $\text{L}^1$ , por serem equivalentes dois a dois, surgem como dois singuletos que integram, cada um, para seis protões (2,03 e 2,10 ppm). No espectro do composto **2** também se observam dois singuletos distintos correspondentes aos dois grupos metilo 3 e 5 do pirazolo que integram, cada um, apenas para 3 protões (2,03 e 2,12 ppm). Os protões da cadeia alifática que une os dois anéis de pirazolo de  $\text{L}^1$ , apresentam apenas dois tripletos, um para os grupos  $-\text{CH}_2$  ( $\text{H}^{\text{a}}/\text{H}^{\text{g}}$ ) vizinhos dos anéis aromáticos, a campo mais baixo (3,95 ppm), que integra para 4 protões, e outro para os grupos  $-\text{CH}_2$  ( $\text{H}^{\text{b}}/\text{H}^{\text{f}}$ ) vizinhos da função amina (2,78 ppm), que também corresponde a 4 protões. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2** também se observam dois tripletos para os protões da cadeia alifática que une o anel de pirazolo à amina secundária mas que integram, cada um, apenas para dois protões (4,05 e 3,02 ppm). Em ambos os espectros, é também possível observar os sinais correspondentes aos protões da cadeia alifática do Alendronato. Observa-se um sinal na forma de multipletto (1,72 para  $\text{L}^1$  e 1,74 ppm para **2**) a campo mais elevado, correspondentes à ressonância dos quatro protões da cadeia do ALN [ $\text{H}^{\text{d}} + \text{H}^{\text{e}}$ ], e um triplete que integra para dois protões ( $\text{L}^1$  a 2,54 ppm e 1,74 ppm para o composto **2**) correspondentes aos protões  $\text{H}^{\text{c}}$ .

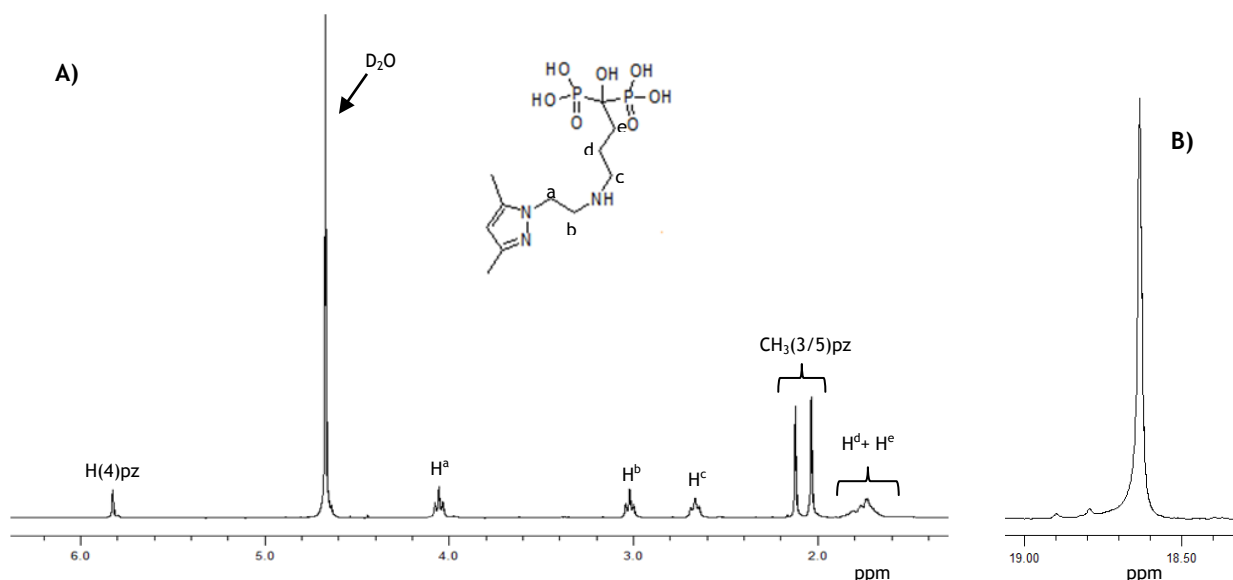


Figura 2.4 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e de  $^{31}\text{P}$  (B) do composto 2 em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{L}^1$  (figura 2.3) e 2, também são coerentes com as estruturas propostas. Ambos os espectros ( $\text{L}^1$  e 2) apresentavam três sinais referentes aos átomos de carbono do anel pirazolilo (149 - 105 ppm), um tripleto desviado para campo baixo devido ao carbono geminal do ALN (74 ppm), cinco sinais distintos para os carbonos etilénicos (54 - 20 ppm) e, finalmente, a campo mais alto, apareciam duas ressonâncias devidas aos grupos metilo do anel pirazolilo (12,2 e 10,3 ppm para  $\text{L}^1$  e 12,2 e 10,3 ppm para 2).

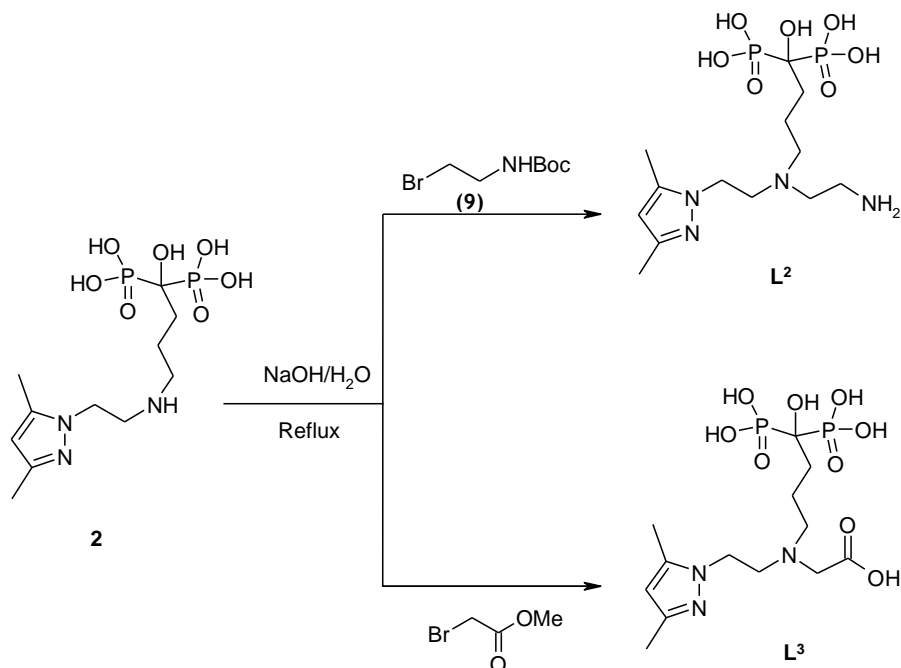
Ambos os compostos  $\text{L}^1$  e 2 apresentaram apenas um singuleto nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  (18,7 ppm), como seria de esperar.

O ligando  $\text{L}^1$  foi ainda caracterizado por espectroscopia de IV. Uma das bandas mais intensas que se observa no espectro de IV surge a  $1119\text{ cm}^{-1}$ , região onde, geralmente, se observam as frequências  $\nu(\text{P}=\text{O})$  de grupos ácidos fosfônicos. O espectro apresenta também uma banda de intensidade média a  $1551\text{ cm}^{-1}$  associada, provavelmente, à vibração de extensão  $\nu(\text{P}-\text{OH})$ .

As formulações propostas para os compostos 2 e  $\text{L}^1$  foram também confirmadas por ESI-MS. Em relação ao ligando  $\text{L}^1$ , o pico maioritário observado a  $m/z=492,2$ , obtido em modo negativo, corresponde ao ião molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , enquanto que o pico maioritário, obtido no modo negativo, para o composto 2 correspondente ao ião molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , surge a  $m/z=370,1$ .

### 2.2.2. Síntese e caracterização de L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup>

O composto **2** revelou-se um intermediário determinante para a síntese de ligandos do tipo pirazolo-diamina e do tipo pirazolo-aminocarboxilato, funcionalizados com alendronato, como se pode observar no esquema 2.2.



Esquema 2.2 - Síntese de L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup>.

O ligando L<sup>2</sup>, neutro e potencialmente tridentado, foi obtido através de uma reacção de *N*-alquilação da amina secundária do intermediário **2** com *N*-terc-Butoxicarbonilo-2-bromoetilamina (**9**), de acordo com o esquema 2.2. A reacção decorreu em H<sub>2</sub>O, à temperatura de refluxo, mantendo o pH a 12, através da adição de NaOH 3 M. Para evitar reacções secundárias, a amina do electrófilo **9**, encontrava-se protegida com um grupo protector Boc. Em geral, este grupo protector é removido apenas em condições ácidas, sendo resistente às condições alcalinas. No entanto, observámos que este grupo protector foi removido nas condições reaccionais utilizadas, originando a formação de produtos secundários que dificultaram a obtenção de L<sup>2</sup>. A mistura reaccional foi purificada por cromatografia numa coluna Sep-Pack C18 usando como eluente um gradiente de MeOH/H<sub>2</sub>O (0/100 → 100/0). O composto L<sup>2</sup> foi obtido sob a forma de um pó ligeiramente amarelado com um rendimento de apenas 22%. Além do rendimento muito baixo, a purificação não foi eficaz e não obtivemos o ligando L<sup>2</sup> completamente puro. Após várias tentativas de repetição da mesma via de síntese recorrendo a outras condições de purificação (purificação por HPLC, por SEP-Pack utilizando como eluentes: TFA 0,1% (aq) e CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1% com gradiente 100/0 → 0/100) e também de outras estratégias de síntese, não foi possível isolar o ligando L<sup>2</sup> totalmente puro para prosseguir com os estudos.

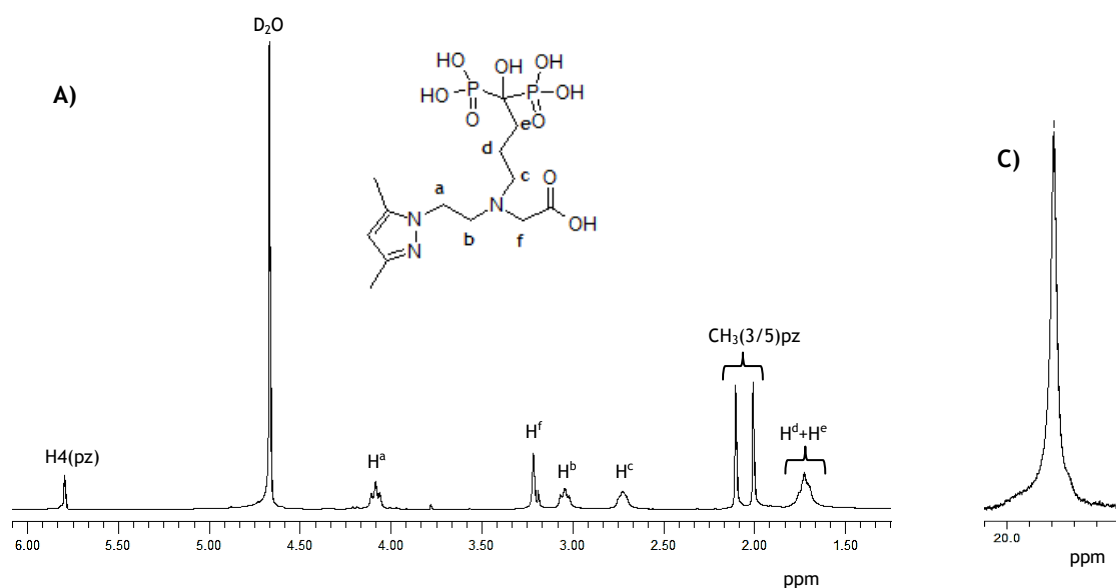


O ligando  $L^3$ , monoaniónico e potencialmente tridentado, foi preparado de modo semelhante ao utilizado para a síntese de  $L^2$  mas utilizando como electrófilo bromoacetato de metilo, em excesso. A reacção decorreu em meio aquoso, a pH 12 e com refluxo durante 2 dias. O progresso da mesma foi seguido por HPLC. Após reacção completa, a mistura reaccional foi purificada por cromatografia. Nesta purificação utilizou-se uma coluna Sep-Pack C18 e como eluente um gradiente de 0/100 a 100/0 de MeOH/H<sub>2</sub>O. O composto  $L^3$  foi obtido sob a forma de um pó branco com um rendimento relativamente elevado ( $\eta$  = 70%).

Os ligandos  $L^2$  e  $L^3$  foram caracterizados por espectroscopia de RMN multinuclear ( $^1H$ ,  $^{13}C$  e  $^{31}P$ ), espectroscopia de IV (excepto  $L^2$ ), espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e HPLC.

As análises espectroscópicas bem como a análise de espectrometria de massa revelaram-se consistentes com a estrutura química proposta para os dois compostos sintetizados, apesar de  $L^2$  não ter sido isolado puro.

Apresentam-se na figura 2.5 os espectros de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e  $^{31}P$  do composto  $L^3$ .



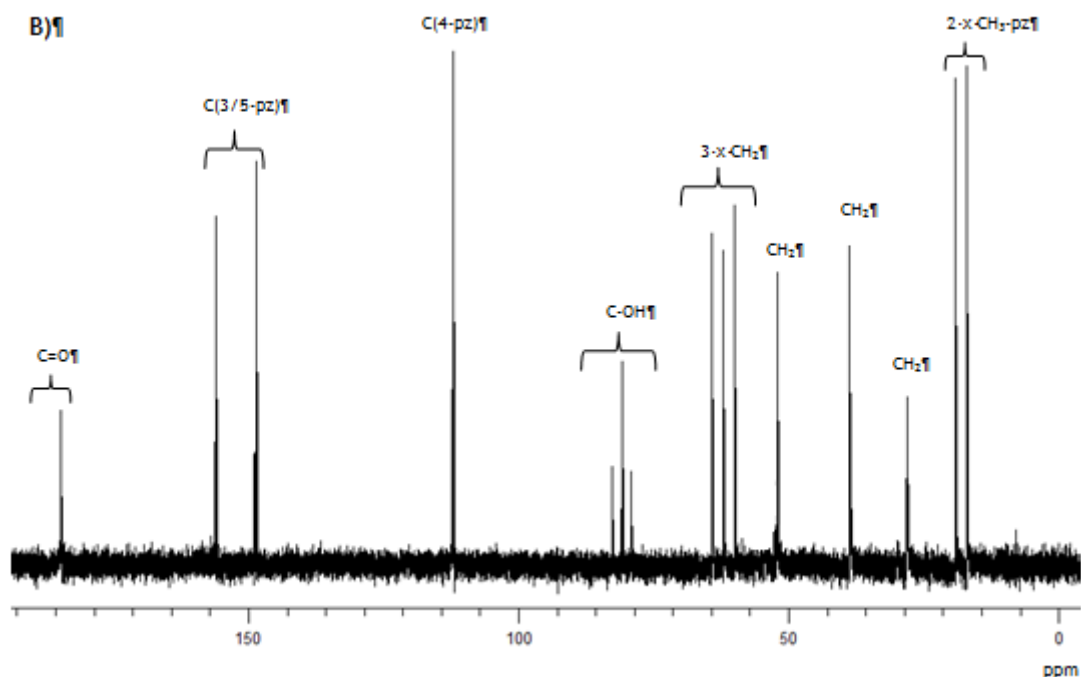


Figura 2.5 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A),  $^{13}\text{C}$  (B) e  $^{31}\text{P}$  (C) do ligando  $\text{L}^3$  em  $\text{D}_2\text{O}$ .

Como se pode observar na figura 2.5,  $\text{L}^3$  apresentava no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  um multipletto a campo mais alto (1,72 ppm) correspondente aos prótons mais próximos do grupo ácido fosfônico ( $\text{H}^d$  e  $\text{H}^e$ ). O próton  $\text{H}(4)$ , os prótons do grupo  $\text{CH}_2^f$  e os dois grupos metilo do anel pirazolilo originaram quatro singuletos a 5,79, 3,21, 2,10 e 2,00 ppm, respectivamente. No espectro podemos ainda observar a presença de três tripletos entre 2,73 e 4,08 ppm.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{L}^3$  também é coerente com a sua estrutura, pois apresentava a um sinal referente ao carbono do ácido carboxílico ( $\text{C}=\text{O}$ ) a campo baixo (177 ppm), três sinais referentes aos átomos de carbono do anel pirazolilo (149 - 105 ppm), um tripleto desviado para campo baixo devido ao carbono geminal do ALN (74 ppm), seis sinais distintos para os carbonos etilénicos (57 - 21 ppm) e, finalmente, a campo mais alto apareciam as duas ressonâncias devidas aos grupos metilo do anel pirazolilo (12,2 e 10,2 ppm).

No espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  observa-se um único singuleto a 18,6 ppm.

O espectro de IV do composto  $\text{L}^3$  apresentava as bandas características do ligando, nomeadamente uma banda intensa a  $1685\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de extensão  $\nu(\text{C}=\text{O})$  do grupo carboxilato, uma banda a  $1261\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à vibração de extensão da ligação  $\text{P}=\text{O}$  e outra a  $1135\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de extensão da ligação  $\text{P}-\text{OH}$ , ambas do grupo ácido fosfônico.

As formulações propostas para  $\text{L}^2$  e  $\text{L}^3$  foram também confirmadas por ESI-MS. Na figura 2.6, apresenta-se o espectro de massa obtido no modo positivo para o composto  $\text{L}^3$ .

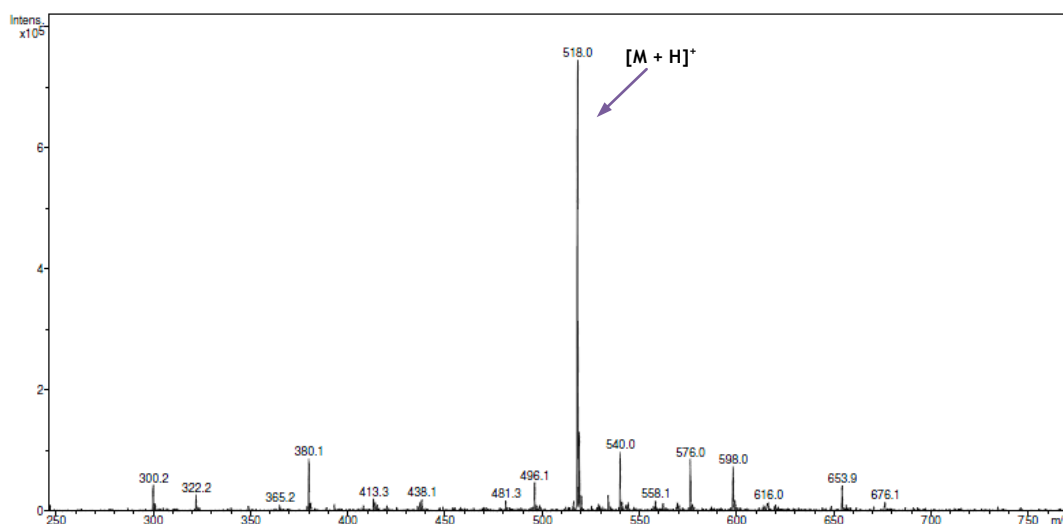


Figura 2.6 - ESI-MS do composto L<sup>3</sup> no modo positivo.

Da sua análise pode-se concluir que a formulação proposta para o composto L<sup>3</sup> foi confirmada por ESI-MS. O pico maioritário observado a  $m/z = 518,0$ , obtido em modo positivo, corresponde ao íon molecular  $[M + H]^+$ .

A título de exemplo, mostram-se na figura 2.7 o espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para o composto L<sup>2</sup>.

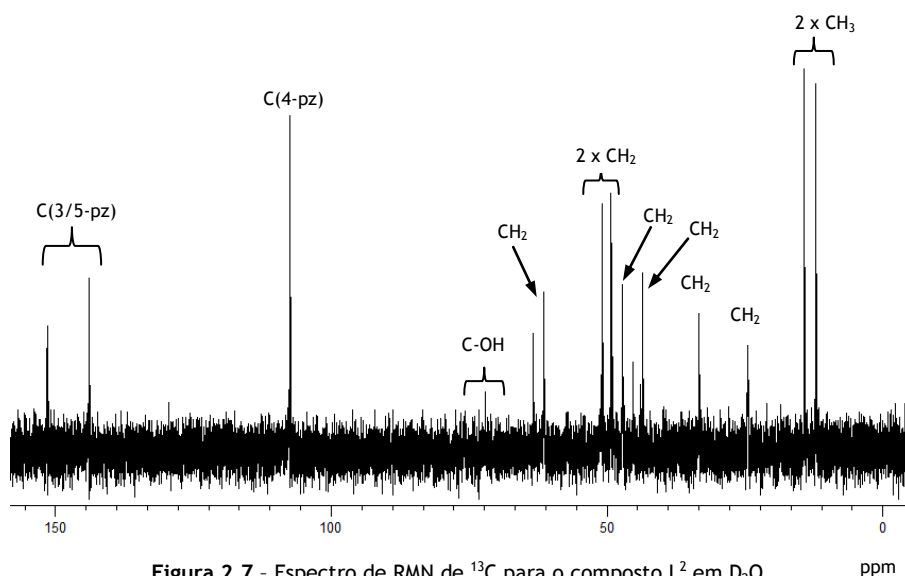


Figura 2.7 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C para o composto L<sup>2</sup> em D<sub>2</sub>O.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C de L<sup>2</sup> embora apresente outros picos de menor intensidade é coerente com a estrutura apresentada para L<sup>2</sup>, três sinais a campo mais baixo referentes aos átomos de carbono do anel pirazólico (151 - 107 ppm), um sinal a 73 ppm referente devido ao carbono geminal do ALN, sete sinais distintos para os carbonos etilénicos (63 - 24 ppm) e, finalmente, a campo mais alto apareciam as duas ressonâncias devidas aos grupos metilo do anel pirazólico (14,2 e 12,0 ppm). No espectro de RMN de <sup>31</sup>P observa-se um único singuleto a 18,4 ppm.

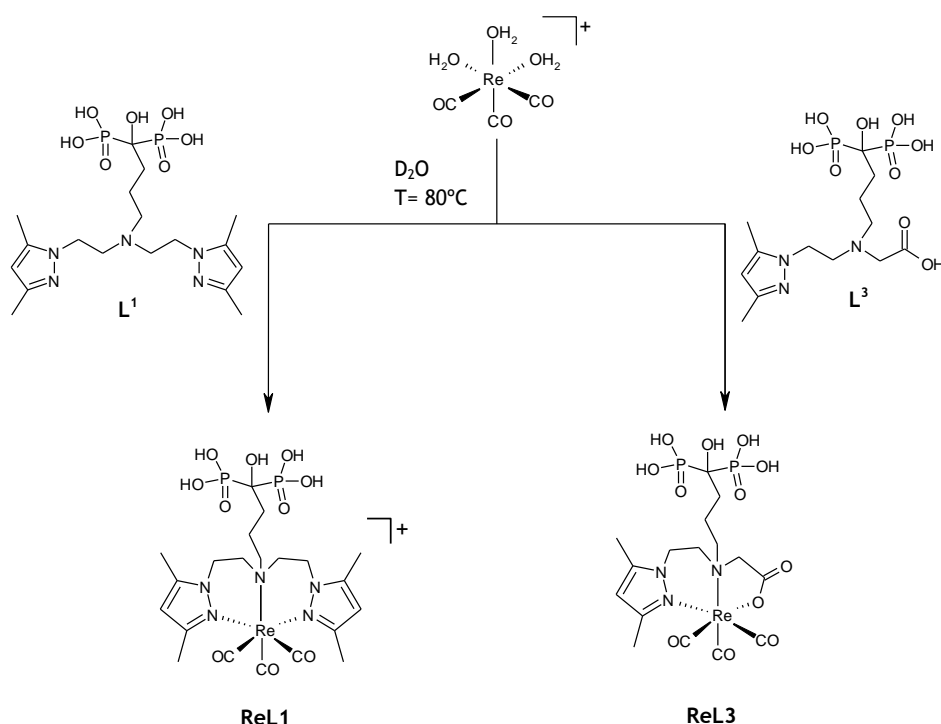
### 2.2.2.1. Outras vias de síntese estudadas para $L^2$

Como não conseguimos obter o ligando  $L^2$  com rendimento razoável e com elevado grau de pureza, tentámos efectuar a sua síntese seguindo uma metodologia idêntica à utilizada para preparar o Alendronato a partir do ácido 4-aminobutírico. Esta aproximação envolveu a transformação do grupo funcional ácido carboxílico em ácido bisfosfónico. Contudo, esta metodologia não conduziu à formação do produto desejado.

## 2.3. Síntese e Caracterização dos Complexos de Rénio: ReL1 e ReL3

Os complexos organometálicos  $fac-[Re(CO)_3(\kappa^3-L1)]^+$  (ReL1) e  $fac-[Re(CO)_3(\kappa^3-L3)]$  (ReL3) foram obtidos fazendo reagir respectivamente o ligando  $L^1$  e  $L^3$  com o precursor  $fac-[Re(H_2O)_3(CO)_3]Br$ . O precursor  $fac-[Re(H_2O)_3(CO)_3]Br$  foi sintetizado a partir do complexo  $[ReBr(CO)_5]$ , de acordo com o procedimento descrito na literatura.<sup>[51]</sup>

Assim, de modo a avaliar a capacidade de coordenação dos ligandos  $L^1$  e  $L^3$  face à unidade  $fac-[Re(CO)_3]^+$ , fez-se reagir estes ligandos ( $L^1$  e  $L^3$ ) com o precursor  $fac-[Re(H_2O)_3(CO)_3]Br$ , numa relação molar de 1:1, como se indica no esquema 2.3.



Esquema 2.3 - Síntese dos complexos ReL1 e ReL3.

### 2.3.1. Síntese dos complexos ReL1 e ReL3

As reacções de síntese dos complexos **ReL1** e **ReL3**, foram conduzidas em tubo de RMN em D<sub>2</sub>O, a pH 7 (ReL1) e pH 4 (ReL3) e à temperatura de 80°C. A formação de ambos os complexos ReL1 e ReL3 foi seguida por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P.

Depois de um dia de reacção, e após arrefecimento à temperatura ambiente, as misturas reaccionais foram purificadas numa coluna Sep-Pack C18, obtendo-se os compostos finais ReL1 e ReL3 puros e sob a forma de pó branco com rendimentos de 13% e 27%, respectivamente. Contudo, a análise da mistura reaccional por RMN (ReL1 e ReL3) parecia indicar que ambos os complexos se tinham formado com rendimentos relativamente elevados, o que pode ser indicativo de ter ocorrido retenção dos complexos na coluna C18 durante a purificação.

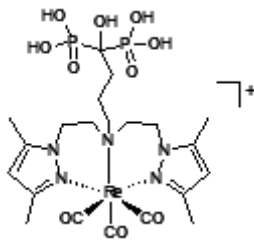
Os complexos **ReL1** e **ReL3** são estáveis face à oxidação bem como à hidrólise. Ambos os complexos são parcialmente solúveis em metanol e em água e insolúveis em solventes orgânicos apolares (ex: acetonitrilo, diclorometano).

### 2.3.2. Caracterização dos complexos ReL1 e ReL3

A caracterização dos complexos **ReL1** e **ReL3** envolveu as técnicas espectroscópicas usuais RMN de <sup>13</sup>C (excepto ReL3), <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P, IV e espectrometria de massa (ESI-MS). Estes complexos foram ainda analisados por HPLC.

A título de exemplo, na tabela 2.1 apresentam-se os dados espectroscópicos de RMN de <sup>13</sup>C do complexo em estudo ReL1. A caracterização do complexo ReL1 por <sup>13</sup>C foi feita antes da sua purificação.

Tabela 2.1 - Dados de RMN de <sup>13</sup>C do complexo ReL1.

 <p>Fórmula de Estrutura</p>	
	δ ( <sup>13</sup> C)
C ≡ O	199,2; 198,5
C(3/5)pz	149,4; 141,8
C(4)pz	105,0
C-OH	*
CH <sub>2</sub>	54,4; 52,5; 43,7; 32,6; 20,0
CH <sub>3</sub> -pz	12,3; 10,3

\*Não foi possível distinguir o sinal da linha de base

No espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  do complexo **ReL1** observa-se a presença de um único singuleto a um desvio químico de 23,03 ppm, desviado para campo baixo relativamente ao ligando livre **L1** ( $\Delta = 4,33$ ). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **ReL1** apresenta um único singuleto, a 5,95 ppm (2H), atribuível aos dois prótons H(4) dos dois anéis de pirazolo, e dois singuletos a 2,14 ppm (6H) e 2,05 ppm (6H), devidos aos quatro grupos metilo. Estas observações indicam que os dois anéis de pirazolo são quimicamente equivalentes e que, por esse motivo, o complexo **ReL1** tem um plano de simetria. O espectro inclui ainda três multipletos para os oito prótons da cadeia alifática que une os dois anéis aromáticos (4,38 ppm, 3,58 ppm e 3,29 ppm). Todos os sinais se encontram desviados para campo baixo relativamente ao ligando livre. É ainda possível observar as ressonâncias devidas aos prótons referentes ao ALN (3,06 ppm (2H) e 1,97 ppm (4H)). Este resultado indica que a unidade bisfosfonato não se encontra envolvida na coordenação ao centro metálico, apesar de ser potencialmente coordenante.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **ReL1** foi possível observar as ressonâncias esperadas para o anel pirazolilo [C(3/5)pz] ( $\delta$  149,4 e  $\delta$  141,8 ppm) e  $\delta$ 105,0 ppm para C(4)pz. Os ligandos carbonilo ( $\text{C}\equiv\text{O}$ ), têm sinais de muito baixa intensidade aparecendo a 199,2 e 198,5 ppm.

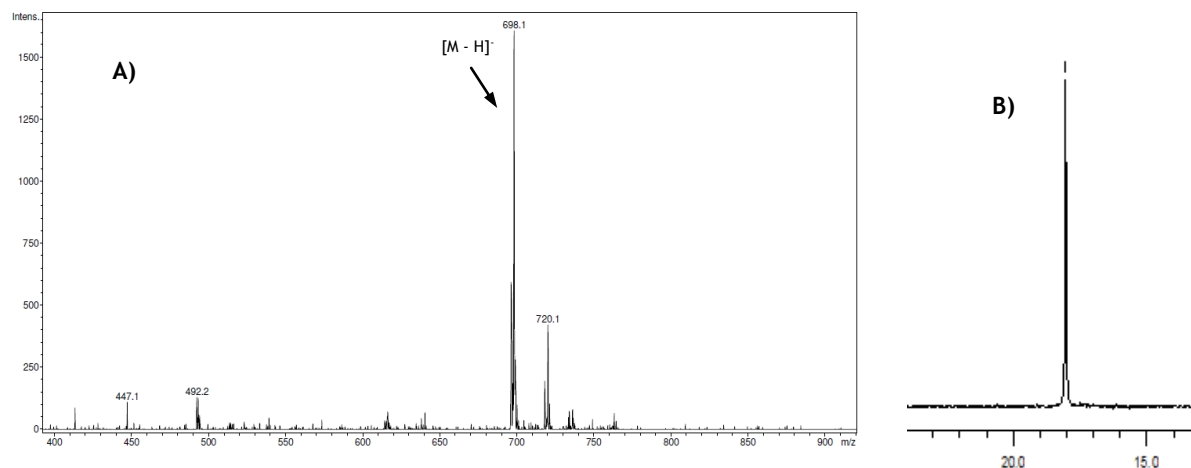
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do complexo **ReL3** apresentava um singuleto (5,99 ppm) atribuído ao próton H(4) do anel pirazolilo e dois singuletos com desvios químicos a  $\delta$  2,13 e 2,29 ppm, devidos aos grupos metilo das posições 3 e 5 do mesmo anel. Observaram-se ainda quatro multipletos devidos aos seis prótons diastereotópicos da cadeia carbonada alifática do ligando **L<sup>3</sup>**. O sinal referente aos prótons do ALN ligados à amina central foram desviados para campo baixo, enquanto que as ressonâncias devidas aos grupos  $\text{CH}_2$  do ALN (1,80 ppm, 4H) mais próximas da unidade bisfosfonato não sofreram desvio significativo face às mesmas ressonâncias nos respectivo ligando **L<sup>3</sup>** (1,72 ppm, 4H). Este resultado confirma que a unidade bisfosfonato, apesar de possuir grupos potencialmente coordenantes, não se encontra envolvida na ligação ao centro metálico.

No espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  observa-se um único singuleto a 18,3 ppm (figura 2.8 B).

Ambos os complexo **ReL1** e **ReL3** foram também caracterizados por espectroscopia de IV. A característica mais significativa destes espectros é a presença de bandas atribuíveis às vibrações de extensão  $\nu(\text{C}\equiv\text{O})$ , a frequências na região de  $2020\text{ cm}^{-1}$  e  $1820\text{ cm}^{-1}$  e  $2026 - 1891\text{ cm}^{-1}$ , para os complexos **ReL1** e **ReL3**, respectivamente, o que é indicativo da presença da unidade *fac*- $[\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ . Estas bandas apresentam um perfil característico do arranjo facial dos grupos carbonilo. O facto de surgirem ligeiramente desviadas para frequências superiores relativamente ao precursor *fac*- $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  ( $2000, 1869\text{ cm}^{-1}$ ), indica-nos que existe coordenação ao centro metálico.

A caracterização de complexo **ReL3** por espectroscopia de IV permitiu ainda confirmar a coordenação do grupo carboxilato, uma vez que a banda  $\nu(\text{C}=\text{O})$  aparece centrada a  $1617\text{ cm}^{-1}$ , desviada ( $\Delta = 68\text{ cm}^{-1}$ ) para frequência mais baixa comparativamente ao ligando livre.

A formulação proposta para os complexos **ReL1** e **ReL3** foi também confirmada por ESI-MS. A título de exemplo na figura 2.8 apresentam-se os dados espectroscópicos de RMN  $^{31}\text{P}$  do complexo de ReL1, bem como o seu respectivo espectro de massa. O pico maioritário observado a  $m/z = 698,0$ , obtido em modo negativo, corresponde ao ião molecular  $[\text{M} - \text{H}]^-$ .



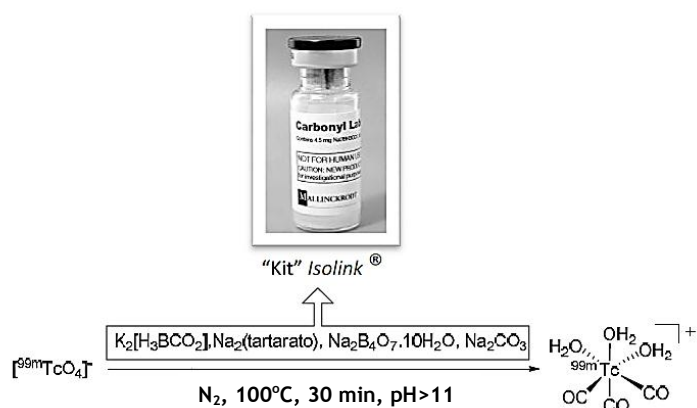
**Figura 2.8** - Espectros de Massa obtido em modo negativo (A) e de RMN de  $^{31}\text{P}$  (B) do complexo ReL3, em  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 2.3.3. Síntese e Caracterização do complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ : TcL1 e TcL3

Como foi visto atrás, os ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$  permitiram estabilizar um complexo de  $\text{Re}(\text{I})$  estável face à oxidação e hidrólise, com uma estrutura bem definida. Tendo em conta este comportamento favorável decidiu-se estudar a possibilidade de preparar os complexos análogos com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , com o objectivo de avaliar o interesse destes ligandos funcionalizados com alendronato para o desenvolvimento de radiofármacos para detecção de metástases ósseas.

#### *Preparação do precursor organometálico $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ :*

Os complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$  foram preparados em meio aquoso a partir do precursor  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . Este precursor organometálico é preparado num único passo por redução do  $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ , eluído de um gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  com soro fisiológico, com boranocarbonato de potássio ( $\text{K}_2(\text{H}_3\text{BCO}_2)$ ). O boranocarbonato de potássio, em meio alcalino, funciona simultaneamente como redutor do metal e como fonte de monóxido de carbono.



Esquema 2.4 - Síntese do precursor organometálico  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

A disponibilidade de um "kit" liofilizado contendo os reagentes necessários à síntese permite a obtenção do precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , com elevado rendimento e elevada pureza radioquímica. Este procedimento envolve a adição de  $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$  eluído do gerador ao *kit*, seguida de aquecimento a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Após a redução do  $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$  a  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ , que decorre em meio alcalino, o excesso de boranocarbonato é destruído por neutralização com uma solução de  $\text{HCl}$ . A pureza radioquímica do precursor foi confirmada por RP-HPLC, imediatamente antes da preparação dos complexos.

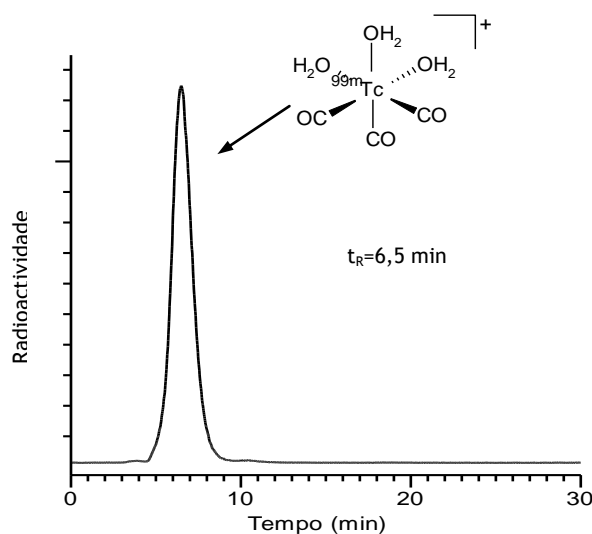
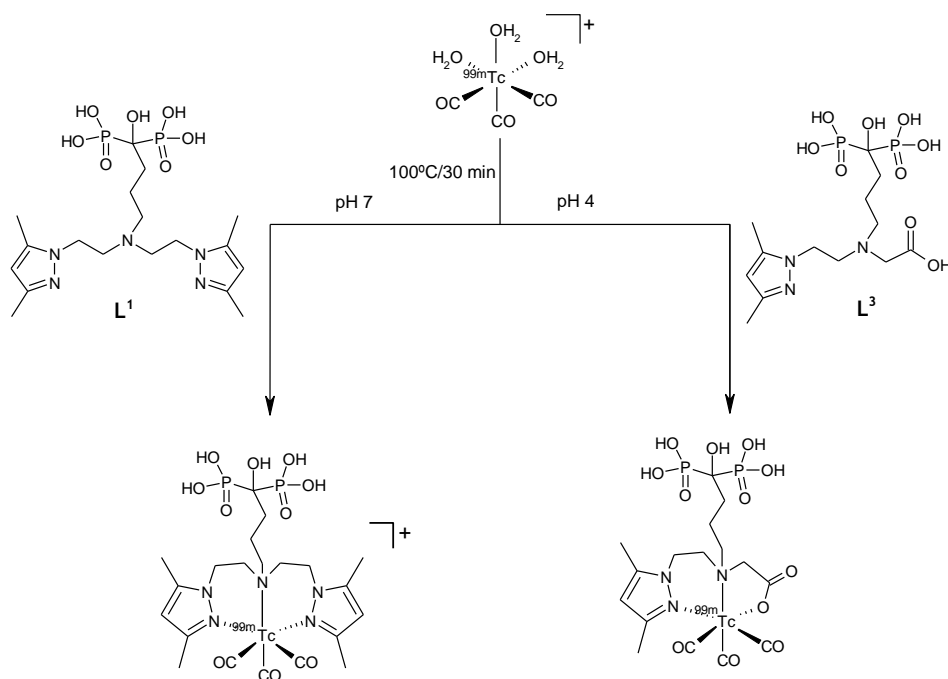


Figura 2.9- Radiocromatograma do precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $\text{TcL1}$  e  $\text{TcL3}$ , foram obtidos fazendo reagir o precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  com os ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$ , respectivamente (esquema 2.5). As condições reaccionais, para a síntese dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ , foram optimizadas em relação à concentração final de ligando ( $\text{L}^1$  ou  $\text{L}^3$ ), tempo, temperatura de reacção, e ainda o pH de marcação. Esta optimização, teve como base as condições mais favoráveis encontradas previamente no grupo para a síntese de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  com ligandos análogos contendo a unidade pirazolo.





Esquema 2.5 - Síntese dos complexos  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-L}^1]^+$  (TcL1) e  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-L}^3]$  (TcL3)

O complexo radioactivo,  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-L}^1]^+$ , (TcL1) foi obtido a pH fisiológico, após aquecimento à temperatura de 100°C durante 30 minutos, utilizando uma concentração final de ligando L1 de  $10^{-4}$  M. Nestas condições, o complexo TcL1 foi obtido com bom rendimento e pureza radioquímica (>90%).

Para obter o complexo radioactivo,  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-L}^3]$ , (TcL3), foi necessário ajustar o pH do precursor,  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , a pH 4 e aquecer a 100°C durante 45 minutos, utilizando uma concentração final de ligando L<sup>3</sup> de  $10^{-3}$  M.

Tal como referido anteriormente, a caracterização dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  não pode ser efectuada pelos métodos usuais em química inorgânica, devido às baixas concentrações dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  em solução. Assim, admite-se que os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  tenham a mesma estrutura dos seus análogos de Re se apresentarem idêntico comportamento cromatográfico, quando analisados por HPLC, nas mesmas condições experimentais. Um detector de radiação  $\gamma$  permite a detecção dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  e um detector de radiação ultravioleta-visível (UV/Vis) permite a detecção dos complexos de Re. Deste modo, a estrutura dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL1 e TcL3) foi estabelecida por HPLC comparando o seu tempo de retenção com o dos complexos análogos de rénio, ReL1 e ReL3, respectivamente ( $t_R$  (TcL1)= 15,70 min;  $t_R$  (ReL1)= 15,52 min;  $t_R$  (TcL3)= 10,60 min;  $t_R$  (ReL3)= 10,58 min). Na figura 2.10 apresentam-se os cromatogramas de HPLC do complexo TcL3 e ReL3.

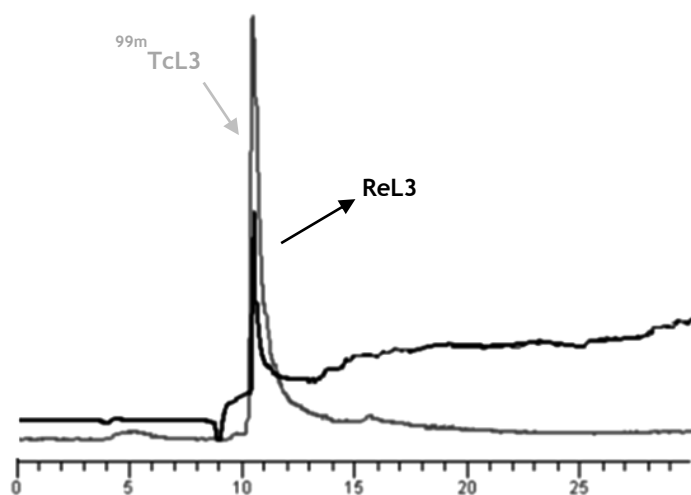


Figura 2.10 - Cromatogramas de HPLC dos complexos TcL3 (detecção  $\gamma$ ) e ReL3 (detecção UV).

A pureza radioquímica dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foi determinada por HPLC de fase reversa e por cromatografia em ITLC-SG (cromatografia instantânea de camada fina, em sílica-gel). Os radiocromatogramas obtidos após eluição em Acetona (Radiocromatograma A) ou em Metanol/HCl 6 N (95/5) (Radiocromatograma B) são apresentados na figura 2.11.

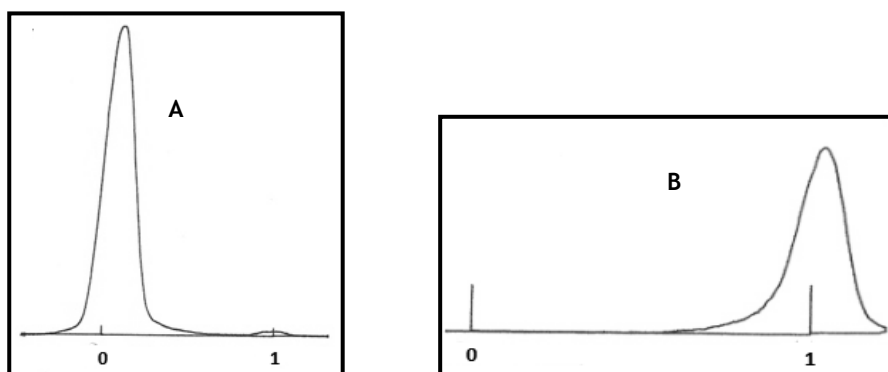


Figura 2.11 - Radiocromatograma de TcL3 em (A) MeOH/HCl 6 N (95/5) e (B) Acetona.

No sistema cromatográfico A (ITLC-SG/Acetona) o complexo TcL3 tem  $R_f=0$  e as espécies radioquímicas  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  e  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  têm  $R_f=1$ . No sistema cromatográfico B (ITLC-SG/Metanol/HCl 6 N (95/5)) o complexo TcL3 tem  $R_f=1$  e as espécies coloidais têm  $R_f=0$ .

A análise dos radiocromatogramas A e B, permitiu-nos concluir que o complexo TcL3 tem uma pureza radioquímica superior a 97% não sendo detectada a presença de colóides.

A pureza radioquímica determinada por HPLC de fase reversa foi ligeiramente inferior (aproximadamente 94%), possivelmente devido à retenção do complexo radioactivo na coluna.

## 2.4. Avaliação Biológica do Complexo de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ - **TcL3**

### 2.4.1. Estudos *in vitro*

#### 2.4.1.1. Estabilidade em tampão fosfato salino pH 7,4 e em Soro Humano

Os estudos de estabilidade *in vitro* indicam se os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  têm a capacidade de se manter intactos em condições aquosas e fisiológicas, o que é um requisito essencial para a sua utilização no desenvolvimento de radiofármacos. Por outro lado, permitem prever a estabilidade dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  *in vivo*, face à reoxidação e transquelatação do ligando por substratos biológicos que apresentem afinidade para o metal. Estes ligandos biológicos podem ser proteínas, aminoácidos ou outras moléculas presentes em circulação ou nos tecidos. Procedeu-se assim ao estudo da estabilidade *in vitro* do complexo **TcL3** em condições fisiológicas. Os meios fisiológicos testados foram o tampão fosfato salino (PBS pH 7,4) e o soro humano (SH).

O complexo **TcL3** foi incubado em PBS, a pH 7,4 e a 37 °C. A solução foi analisada por HPLC, ao longo do tempo (1, 6 e 24 horas), verificando-se que o complexo **TcL3** é estável, não sofreu reoxidação a  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$  ou outros processos de degradação.

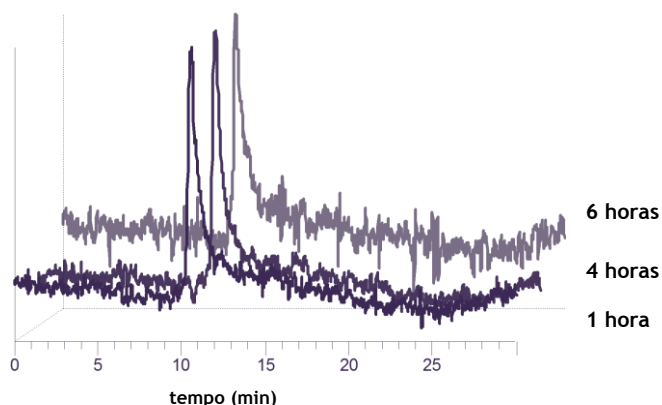
Para os ensaios realizados em soro humano adicionaram-se 50 µl da solução do complexo radioactivo **TcL3** a 500 µl de soro humano e colocou-se a incubar a 37 °C. Alíquotas de 50 µl da mistura reaccional foram sendo retiradas ao longo do tempo (1, 2, 4 e 24 horas), tratadas com etanol, para precipitação das proteínas, centrifugadas e o sobrenadante foi analisado por HPLC.



**Figura 2.12** - Cromatogramas de HPLC de **TcL3** (detecção  $\gamma$ ), antes de incubar (A), após 1 hora e 6 horas de incubação em PBS pH 7, (B e C respectivamente).

Tal como se pode observar pela **figura 2.12**, o composto demonstrou ser estável ao longo do tempo, pois não se observou decomposição ou reoxidação a pertecnetato por HPLC. A título de exemplo, apresentam-se os cromatogramas de HPLC obtidos para o complexo TcL3 antes de incubar (**fig. 2.12 A**), após 1 hora e 6 horas de incubação em PBS (**fig. 2.12 B e C respectivamente**).

Na **figura 2.13** apresentam-se os cromatogramas de HPLC obtidos para o complexo TcL3 após 1, 4 e 6 horas de incubação em soro humano (**B e C respectivamente**).



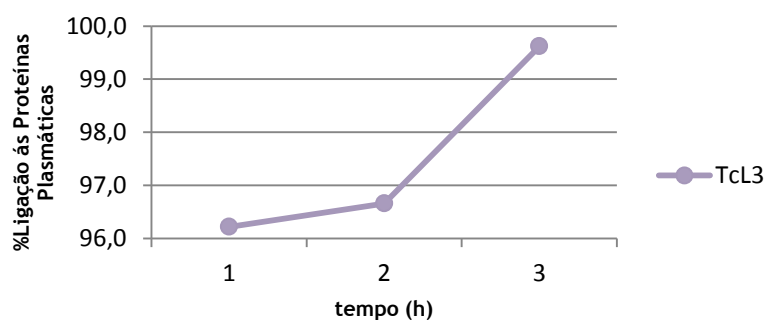
**Figura 2.13** - Cromatogramas de HPLC de TcL3 (detecção  $\gamma$ ), após 1 hora, 4 e 6 horas de incubação em soro humano (A e B respectivamente)

Estes resultados incentivaram a realização dos estudos biológicos *in vivo* e a avaliação deste complexo em termos de afinidade para o osso, fixação em órgão não alvo e excreção.

#### 2.4.1.2. Ligação às Proteínas Plasmáticas

A determinação da percentagem de ligação às proteínas plasmáticas é também importante pois afecta a distribuição biológica dos compostos e a sua fixação nos órgãos alvo.

Esta ligação foi determinada pela razão entre a radioactividade presente no precipitado (fracção proteica), após precipitação das proteínas com etanol e separação do sobrenadante, e a radioactividade total da amostra.



**Figura 2.14** - Ligação do complexo TcL3 às proteínas plasmáticas.

O complexo complexo **TcL3** apresenta uma rápida e elevada ligação às proteínas, tendo-se obtido uma percentagem de ligação de 96% após 1h de incubação a 37 °C. Esta elevada ligação às proteínas pode ser considerada um aspecto relativamente negativo, uma vez que pode contribuir para um perfil farmacocinético desfavorável, com diminuição das taxas de eliminação sanguínea e de excreção do complexo. No entanto, há que referir que esta ligação pode ser reversível, tal como verificado por exemplo para o radiofármaco renal aprovado para uso clínico  $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ .<sup>[52]</sup> Este radiofármaco tem uma elevada ligação às proteínas plasmáticas, cerca de 90% após injeção intravenosa, mas apresenta uma rápida eliminação renal via secreção tubular, o que reflecte a reversibilidade da sua ligação às proteínas pois apenas o complexo não ligado pode sofrer secreção ao nível dos túbulos renais.<sup>[53]</sup>

#### 2.4.1.3. Adsorção à Hidroxiapatite

Como já foi referido anteriormente a HA é o principal componente da matriz inorgânica do osso. Deste modo, o objectivo dos estudos de adsorção à HA, consistiram em avaliar se a afinidade do aminobisfosfonato ALN para o osso, foi afectada pela incorporação do complexo organometálico. Os ensaios de adsorção do complexo **TcL3** à HA, após 1h de incubação a 37 °C, em função da massa de HA (2,5 mg, 10 mg, 20 mg e 50 mg) permitiram obter os resultados apresentados na figura 2.15.

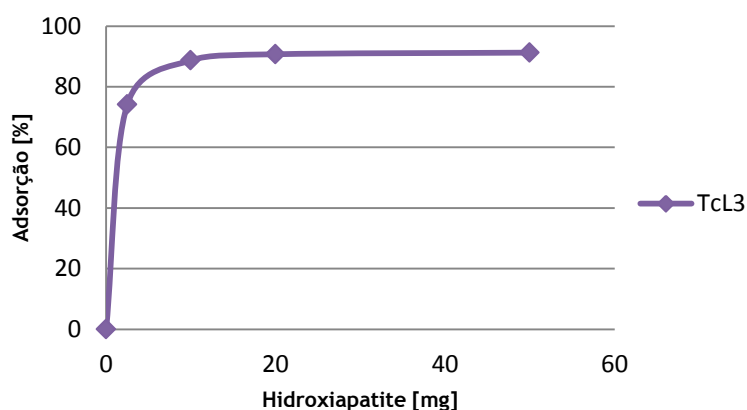


Figura 2.15 - Percentagem de ligação de TcL3 à HA (1 h de incubação a 37°C) (n=3).

A análise dos resultados de adsorção apresentados na figura 2.15, permitiu concluir que a cinética de ligação do complexo **TcL3** à HA é rápida, atingindo um valor acima de 90% quando utilizamos 20 mg de HA. No entanto, com 10 mg de HA já se observa uma ligação da ordem dos 89%, pelo que se optou por estudar a adsorção do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  em estudo a apenas 15 mg de HA em função do tempo de incubação (tabela 2.2).

**Tabela 2.2** - Percentagem de ligação a 15mg de HA, determinada para o complexo TcL3, em função do tempo de incubação a 37°C

tempo (h)	% Ligação à HÁ
0	88,29 ± 0,31
1	90,92 ± 0,12
2	92,31 ± 0,17
4	91,35 ± 0,15

A análise dos resultados de adsorção à HA obtidos em função do tempo de incubação (0, 1, 2 e 4 horas) permitiu concluir que, o processo de ligação do complexo TcL3 à HA é muito rápido. Ao fim de 1h de incubação verificamos que a percentagem de ligação à HÁ é superior a 90%. Este resultado parece indicar que o complexo TcL3, vectorizado com o alendronato, mantém elevada afinidade para o osso.

#### 2.4.1.4. Determinação da Lipofilia

A lipofilia do complexo TcL3 foi determinada estudando a partição deste complexo no sistema bifásico n-octanol/tampão fosfato pH=7,4, pelo método de *shake flask*.<sup>[54]</sup> Resumidamente, os complexos de <sup>99m</sup>Tc foram adicionados a uma mistura de n-octanol e PBS. Após agitação, procedeu-se à centrifugação para uma separação eficiente das fases. Seguidamente, recolheram-se alíquotas de cada uma das fases e mediu-se a actividade num contador gama. A uma alíquota da fase que tinha maior actividade (fase orgânica) foi adicionado PBS e voltou-se a agitar, a separar as fases e a ler a actividade de cada uma delas. O coeficiente de partição ( $D_{O/A}$ ) é a razão entre a actividade da fase orgânica e a da fase aquosa. Este método de determinação da lipofilia de compostos radioactivos tem a vantagem de ser relativamente expedito, mas apresenta a desvantagem de exigir compostos de elevada pureza radioquímica. Os resultados obtidos foram expressos sob forma de Log  $D_{O/A}$  (pH=7,4).

Analizando os resultados apresentados na tabela 2.3, conclui-se que o complexo TcL3 apresenta carácter hidrofílico acentuado.

**Tabela 2.3** - Valores de Log  $D_{O/A}$  determinados para o complexo de <sup>99m</sup>Tc (TcL3)

Complexo	Actividade média lida octanol (cpm)	Actividade média lida PBS (cpm)	$D_{O/A}$	Log $D_{O/A} \pm s$
TcL3	7877	1200910	0,0065592	-2,18 ± 0,02

## 2.4.2. Estudos *in vivo*

### 2.4.2.1. Biodistribuição

O comportamento biológico do complexo **TcL3** foi estudado em ratinhos fêmea *Balb-c*, para avaliar a sua biodistribuição, farmacocinética e estabilidade *in vivo*. Para além de verificar a afinidade do complexo para o osso e a sua fixação em órgãos não alvo, pretendeu-se também, com este estudo, determinar a taxa de depuração sanguínea e identificar as vias de excreção envolvidas na eliminação do composto, parâmetros que são muito importantes no desenvolvimento de radiofármacos. De uma maneira geral, a taxa de depuração sanguínea deve ser rápida o suficiente para evitar irradiação excessiva do paciente, mas lenta o suficiente para permitir que o complexo esteja em circulação o tempo necessário para que atinja o local alvo.

O estudo da biodistribuição de **TcL3** envolveu a injeção intravenosa de 100  $\mu\text{L}$  (225 - 307  $\mu\text{Ci}$ ) do complexo radioactivo **TcL3**, através da veia da cauda, em ratinhos fêmea *Balb-c* (13 - 19 g). Os animais foram sacrificados a três tempos diferentes (1, 4 e 6,5 h *p.i.*) e os órgãos removidos, pesados e a sua actividade medida. Os resultados de biodistribuição foram expressos em percentagem de dose injectada por órgão total (% A.I./órgão) (tabela 2.4) e ainda por grama de órgão (% A.I./g órgão) (tabela 2.5). A fixação de **TcL3** nos órgãos mais relevantes é apresentada na figura 2.16 sob a forma de histograma. A excreção foi assumida como a diferença entre a actividade administrada e a actividade medida imediatamente após sacrifício. A actividade total no sangue, osso e músculo foi calculada considerando que estes órgãos correspondem a 6, 10 e 40% do peso total do animal, respectivamente.

**Tabela 2.4** - Resultados de biodistribuição (% A.I./órgão) e excreção total (%A.I.) após administração do complexo **TcL3** em ratinhos *Balb-c*

Órgão	% A.I./órgão		
	1 h	4 h	6,5 h
Sangue	6,2 $\pm$ 1,9	1,07 $\pm$ 0,09	0,63 $\pm$ 0,04
Fígado	5,9 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3
Intestino	6,3 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 1,1	9,7 $\pm$ 1,9
Baço	0,03 $\pm$ 0,01	0,024 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,01
Coração	0,06 $\pm$ 0,04	0,024 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,01
Pulmão	0,14 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Rim	0,86 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,06
Músculo	3,0 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2
<b>Osso</b>	<b>14,8 <math>\pm</math> 2,4</b>	<b>19,3 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>14,1 <math>\pm</math> 1,6</b>
Estômago	0,54 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
<b>Excreção Total (% A.I.)</b>	<b>54,0 <math>\pm</math> 4,6</b>	<b>57,6 <math>\pm</math> 2,8</b>	<b>65,3 <math>\pm</math> 2,7</b>

Como se pode observar nas tabelas/histogramas apresentados, a biodistribuição do complexo radioactivo **TcL3**, em ratinhos *Balb-c*, revelou uma elevada fixação óssea e um longo tempo de permanência neste tecido. A acumulação preferencial no osso é relativamente rápida (9,3% A.I./g órgão 1h *p.i.*), atingindo o máximo às 4h após administração ( $12,1 \pm 0,7\%$  A.I./g órgão). A acumulação selectiva no osso, está de acordo com elevada afinidade do complexo radioactivo para a HA, determinada *in vitro*.

O complexo **TcL3** apresenta uma depuração sanguínea relativamente lenta uma vez que ao fim de 1 h ainda temos muita actividade em circulação (6,4; 1,11 e 0,62% A.I./g órgão, à 1, 4 e 6,5 h *p.i.*, respectivamente). Este resultado reflecte a elevada taxa de ligação às proteínas plasmáticas determinada nos ensaios *in vitro* (secção 2.4.1.2).

Relativamente às vias de excreção, a eliminação renal é vantajosa na medida em que é mais rápida e contribui para melhorar a razão alvo/fundo na região abdominal. Para compostos hidrofílicos, como é o caso de **TcL3**, é de esperar que a eliminação ocorra preferencialmente pela via renal. Como esperado, a excreção deste complexo ocorreu preferencialmente pela via renal, mas também foi eliminado pela via hepatobiliar (1 h *p.i.* é visível acumulação moderada de actividade no fígado e no intestino (5,9 e 6,3% A.I./ órgão, respectivamente).

**Tabela 2.5** - Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) após administração do complexo **TcL3** em ratinhos *Balb-c*

Órgão	% A.I./ g órgão		
	1 h	4 h	6,5 h
Sangue	6,4 $\pm$ 2,1	1,11 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,04
Fígado	6,2 $\pm$ 1,2	2,7 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,1
Intestino	3,2 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,7
Baço	0,4 $\pm$ 0,2	0,25 $\pm$ 0,06	0,3 $\pm$ 0,2
Coração	0,5 $\pm$ 0,3	0,17 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,06
Pulmão	1,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
Rim	3,2 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,4
Músculo	0,5 $\pm$ 0,2	0,36 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,02
<b>Osso</b>	<b>9,3 <math>\pm</math> 2,1</b>	<b>12,1 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>8,4 <math>\pm</math> 1,5</b>
Estômago	6,4 $\pm$ 2,1	1,11 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,04



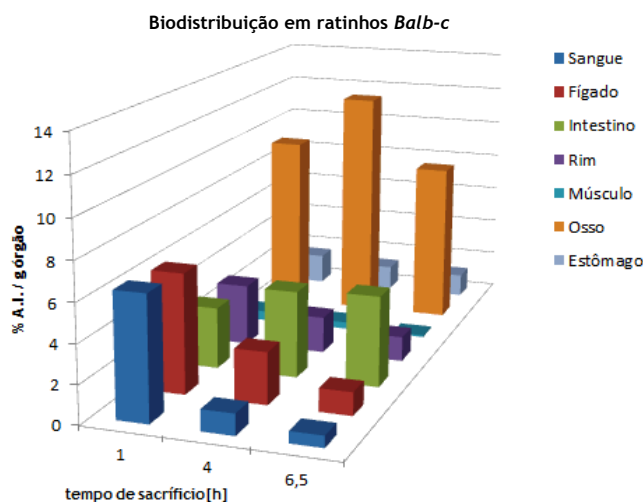


Figura 2.16 - Fixação nos órgãos mais relevantes para o complexo TcL3.

Há ainda a referir que a actividade retida no estômago é baixa, indicando que o complexo é estável *in vivo* não sofrendo reoxidação a  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ , que apresenta uma elevada afinidade para este órgão. Para uma melhor visualização da variação da fixação óssea ao longo do tempo na figura 2.17 apresenta-se um histograma com a percentagem da fixação óssea expressa em %A.I./g órgão.

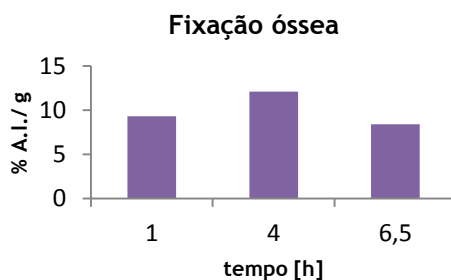


Figura 2.17 - Percentagem de Fixação óssea do complexo TcL3 em função do tempo.

Da análise dos dados apresentados na figura 2.17, concluímos que em ratinhos *Balb-c* o complexo TcL3 apresenta uma elevada fixação óssea. A maior acumulação no osso verifica-se às 4h *p.i.* (12,1% A.I./g órgão). Este valor de acumulação diminui para 8,4% A.I./g órgão ao fim de 6,5 horas *p.i.*

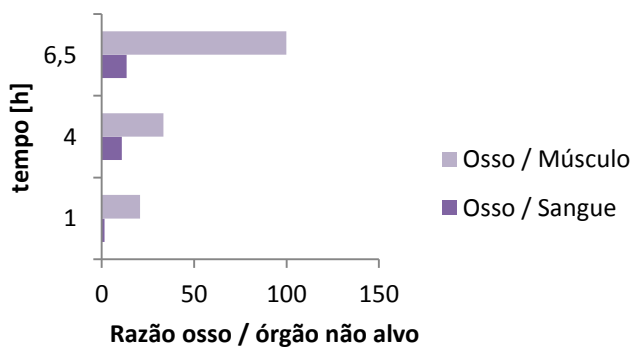


Figura 2.18 - Razão de actividade no órgão alvo (osso) vs órgão não alvo para TcL3 em ratinhos *Balb-c*.

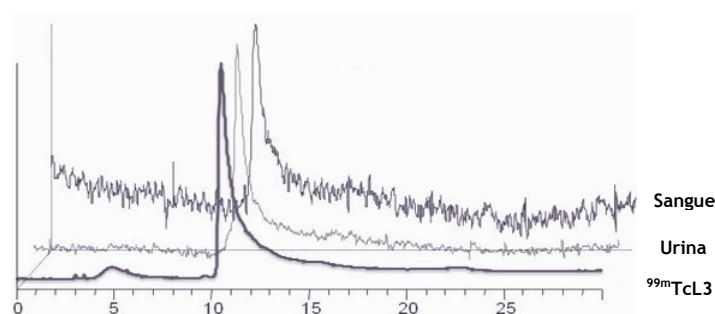
Na figura 2.18 apresentam-se as razões osso/sangue e osso/músculo, para o complexo **TcL3**, em ratinhos *Balb-c*. De um modo geral, para esta estirpe de ratinhos, observamos um aumento dessas razões em função do tempo.

Apesar da elevada fixação óssea observada para o complexo **TcL3**, a lenta depuração sanguínea deste complexo conduz a uma razão entre a actividade no órgão alvo (osso) e a actividade no sangue (razão osso/sangue), relativamente baixa. Contudo, a razão osso/sangue vai aumentando ao longo do tempo devido à retenção do complexo no órgão alvo (osso) e eliminação lenta do sangue.

A razão osso/músculo é mais elevada, principalmente às 6,5h após administração, reflectindo uma depuração muscular mais rápida.

#### 2.4.2.2. Estabilidade no sangue e na urina

Foram ainda realizados estudos de estabilidade *in vivo* através da análise por HPLC de amostras de sangue e urina, retiradas dos animais ao fim de 1h *p.i.* Antes da análise por HPLC, a urina e o sangue foram convenientemente tratados tal como descrito na secção 4.2.2.



**Figura 2.19** - Cromatogramas de HPLC da preparação inicial do complexo **TcL3**, da urina e do sangue de ratinhos recolhidos 1h *p.i.* deste complexo (detecção  $\gamma$ )

Como se pode constatar pelos cromatogramas apresentados na figura 2.19 para o sangue e para a urina, observa-se que a actividade em circulação corresponde quase exclusivamente ao complexo **TcL3**, mesmo ao fim de 1h após administração. A ausência de metabolitos na urina indica que o complexo **TcL3** não é oxidado nem sofre metabolização *in vivo*.

Para além disso, o facto de o complexo se manter intacto na circulação sanguínea significa que poderá atingir o órgão/tecido alvo (osso) na forma química pretendida, potenciando a sua fixação óssea.

### 2.4.3. Comparação com o $^{99m}\text{Tc}$ -MDP

Tal como já se referiu anteriormente o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP é um dos radiofármacos em utilização clínica para o diagnóstico de metástases ósseas, como tal, é deveras importante comparar os resultados obtidos para o complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3) com este radiofármaco, de forma a percebermos de facto se este complexo pode ser ou não promissor para aplicação clínica ao nível do diagnóstico.

O  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP foi avaliado *in vivo* também em ratinhos *Balb-c* e na figura 2.20 apresentam-se esses resultados sob a forma de histograma, juntamente com os resultados de biodistribuição (% A.I./ g órgão) obtidos para TcL3, já descritos anteriormente.

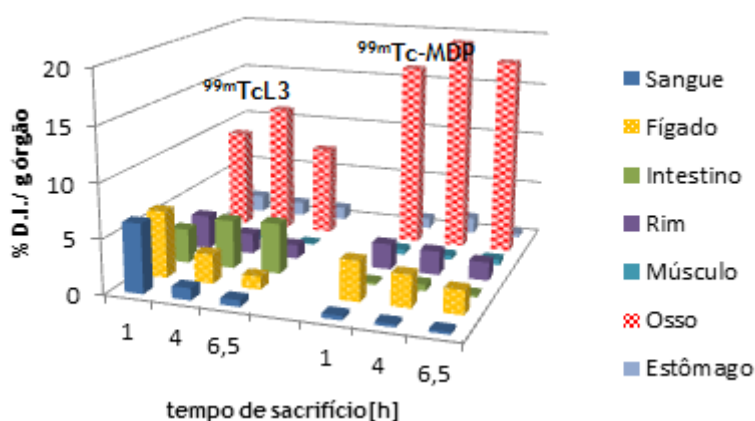


Figura 2.20 - Biodistribuição (% A.I./ g órgão) de TcL3 e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP em ratinhos *Balb-c*.

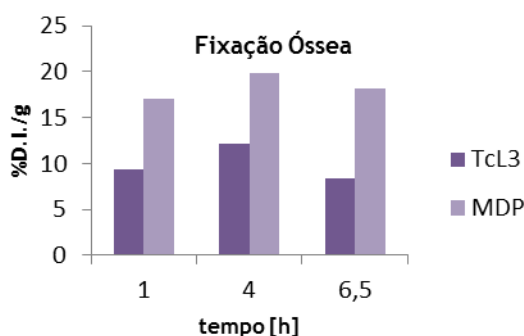


Figura 2.21 - Percentagem de Fixação óssea do complexo TcL3 e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP em função do tempo.

Da análise dos dados apresentados nas figuras 2.20 e 2.21, concluímos que em ratinhos *Balb-c*, o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP é o que apresenta maior fixação óssea.

Relativamente à excreção total em ratinhos *Balb-c* (figura 2.22) os valores determinados para os dois complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e TcL3 são semelhantes.

A excreção total observada após a injeção de TcL3 (54,0 % A.I.; 57,6 % A.I.; 65,3 % A.I.; 1h, 4h e 6,5h *p.i.*, respectivamente), nos ratinhos *Balb-c*, foi relativamente mais elevada comparativamente à excreção observada após injeção do  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (49,0 % A.I.; 56,8 % A.I.; 59,7 % A.I.; 1h, 4h e 6,5h *p.i.*, respectivamente).

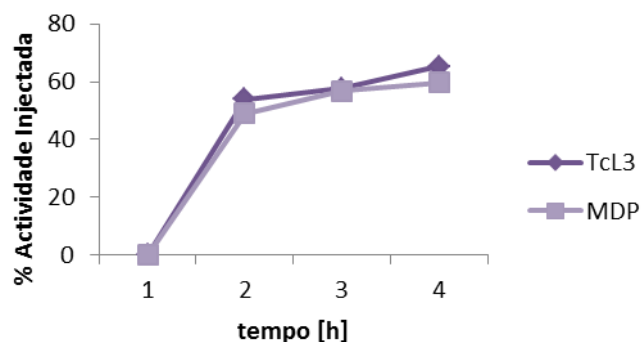


Figura 2.22 - Excreção total (%A.I.) do s complexo TcL3 e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, em ratinhos *Balb-c*, em função do tempo.

Na figura 2.23 apresentam-se as razões osso/sangue e osso/músculo, para os complexos TcL3 e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, em ratinhos *Balb-c*. De um modo geral, para ambos os complexos, observa-se um aumento dessas razões em função do tempo.

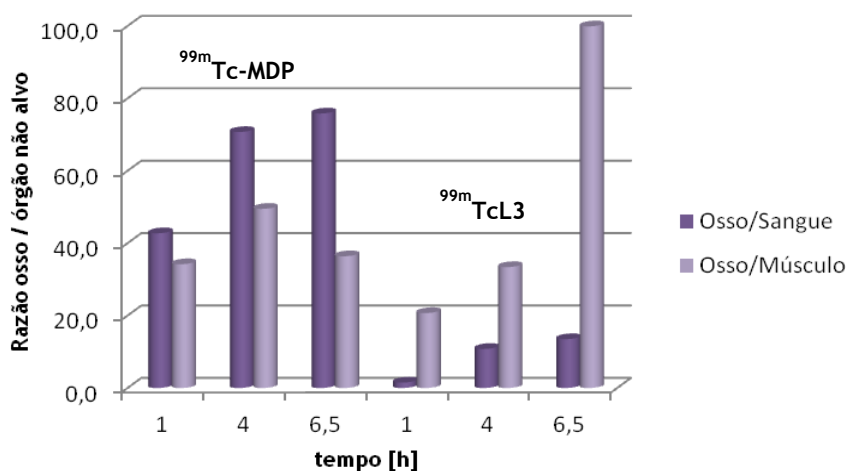


Figura 2.23 - Razão de actividade no órgão alvo (osso) vs órgão não alvo para TcL3 e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP em ratinhos *Balb-c*.

A análise dos resultados demonstra que, a razão entre a actividade no órgão alvo (osso) e a actividade no sangue (razão osso/sangue), é significativamente mais elevada para o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP.

Relativamente à razão osso/músculo, o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP apresenta um valor superior à 1 e 4h *p.i.*, contudo às 6,5h *p.i.* o complexo TcL3 apresenta uma razão osso/músculo significativamente superior.

#### 2.4.4. Estudos em linhas celulares

A avaliação de citotoxicidade dos ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$ , bem como dos seus respectivos complexos de rénio ReL1 e ReL3 foi efectuada pelo método de redução do MTT. Assim, foi avaliada a capacidade dos compostos  $\text{L}^1$ ,  $\text{L}^3$ , ReL1 e ReL3 para inibirem a proliferação celular de células MDAMB231, uma linha celular derivada da mama humana com características metastáticas.

O método de MTT avalia a viabilidade celular através da actividade metabólica das células quantificando a redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases mitocondriais, que são enzimas localizadas na membrana mitocondrial das células viáveis e que estão envolvidas na fosforilação oxidativa, no que resulta a produção de cristais de formazan, no interior das células. Estes cristais podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação por espectrofotometria. (Mossman, 1983). A viabilidade celular é proporcional à redução de MTT.

Resumidamente, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos em estudo (0,2 - 200  $\mu$ M). Seguidamente, o meio foi removido e as células foram incubadas com uma solução de MTT em PBS. Após a remoção do meio foi adicionado DMSO e a absorvância foi medida num espectrofotómetro de placas (Power Wave Xs, Bio-Tek) a 570 nm.

A actividade inibitória dos compostos  $L^1$ ,  $L^3$ , ReL1 e ReL3 na proliferação celular é avaliada através da determinação do  $IC_{50}$ , que é a concentração de composto necessária para provocar 50% de inibição na proliferação celular, no entanto os resultados obtidos não nos permitiram traçar curvas de inibição de forma a determinar o valor de  $IC_{50}$  para os compostos em estudo (figura 2.24).

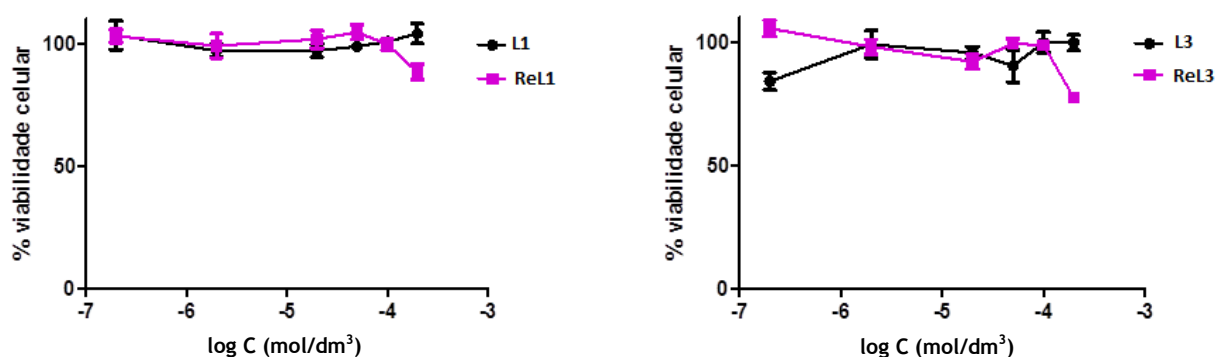


Figura 2.24 - Inibição da proliferação de células MDAMB231 em função da concentração de (A)  $L^1$  e ReL1 e (B)  $L^3$  e ReL3

Da análise dos resultados apresentados na figura 2.25, podemos concluir que nenhum dos compostos estudados ( $L^1$ ,  $L^3$ , ReL1 e ReL3) apresenta citotoxicidade para esta linha tumoral. Para além disso, ao compararmos os resultados obtidos destes mesmos compostos com os do Alendronato (figura 2.25) nas mesmas condições, verificamos que o acoplamento do ALN aos ligandos ( $L^1$  e  $L^3$ ), e respectivos complexos (ReL1 e ReL3), parece diminuir a citotoxicidade dos mesmos.

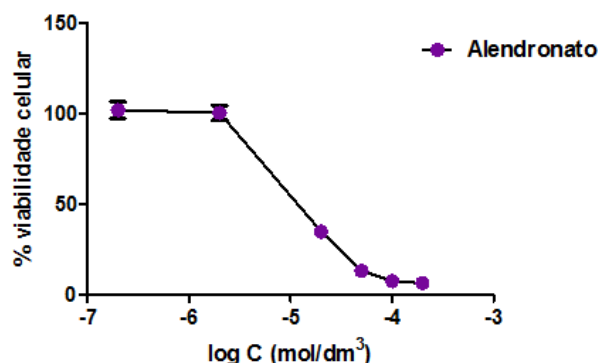


Figura 2.25 - Inibição da proliferação de células MDAMB231 em função da concentração de ALN.



## Capítulo 3

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS





### 3. Conclusões e Perspectivas

Muitos doentes oncológicos em estadio avançado desenvolvem metástases ósseas, normalmente associadas a episódios de dor, apresentando elevada morbilidade e mortalidade.

Actualmente, o diagnóstico das metástases ósseas é efectuado recorrendo a técnicas de imagem utilizando radiofármacos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ , tal como o  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP e o  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP.

De forma a aumentar a sobrevivência dos pacientes com metástases ósseas e proporcionando-lhes uma melhor qualidade de vida, nomeadamente pelo alívio da dor óssea e prevenindo a probabilidade de ocorrência de fracturas patológicas, conservando deste modo a mobilidade, tem-se procurado métodos terapêuticos de forma a tratar as metástases ósseas. Opções terapêuticas são a radioterapia externa, bisfosfonatos (BP), quimioterapia, cirurgia e radiofármacos com afinidade para o osso como o  $[\text{}^{188/186}\text{Re}]\text{HEDP}$ .

Tal como já foi referido anteriormente, os radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP,  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e  $[\text{}^{188/186}\text{Re}]\text{HEDP}$ , em utilização clínica, apresentam algumas limitações, como tal tem-se procurado desenvolver novos radiofármacos potencialmente úteis para imagiologia ou terapia de metástases ósseas.

O objectivo principal do trabalho apresentado nesta tese consistia em encontrar novos radiofármacos potencialmente úteis para Imagiologia Óssea.

A estratégia aplicada na concepção de novos radiofármacos específicos para o osso foi a chamada aproximação bifuncional. Nesta aproximação utilizou-se um ligando bifuncional que continha um conjunto de átomos doadores cuja função era a estabilização do metal, e permitia a introdução de um grupo funcional com afinidade para o osso.

Deste modo, a primeira parte do trabalho incidiu sobre a preparação de novos ligandos bifuncionais que possuíam uma unidade quelante do tipo pirazolo-amina-pirazolo, pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxilato para estabilização do fragmento metálico, e uma unidade com capacidade osteotrópica (bisfosfonato - Alendronato) ( $\text{L}^1$  -  $\text{L}^3$ ). Os compostos  $\text{L}^1$  -  $\text{L}^3$  foram sintetizados e caracterizados pelas técnicas espectroscópicas usuais, embora o ligando  $\text{L}^2$  não tenha sido isolado completamente puro.

Os ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$  foram utilizados para sintetizar complexos do tipo  $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\kappa^3\text{-L}^1)]^+$  (**ReL1**) e do tipo  $\text{fac}[\text{Re}(\text{CO})_3(\kappa^3\text{-L}^3)]$  (**ReL3**) que foram caracterizados pelas técnicas analíticas usuais em química inorgânica.

A reacção de  $\text{fac}[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]\text{Br}$  com os ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$  origina compostos monoméricos em que os ligandos coordenam ao centro metálico de forma tridentada, não havendo interacção entre a unidade bisfosfonato e o metal.

Os resultados promissores obtidos para os complexos de Re(I) com ligandos derivados de pirazolo motivou a realização de estudos ao nível de  $^{99m}\text{Tc}$ . Para estes estudos, escolheram-se os ligandos previamente sintetizados  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$ .

Em meio aquoso, a reacção dos ligandos  $\text{L}^1$  e  $\text{L}^3$  com o precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  originaram os complexos de tricarbonilo de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ ,  $\text{TcL1}$  e  $\text{TcL3}$  com elevado rendimento e pureza radioquímica. Estes complexos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  foram identificados por HPLC de fase reversa por comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos complexos análogos de Rénio. Os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram detectados através da emissão de radiação  $\gamma$  enquanto a detecção dos complexos de Re foi efectuada por ultravioleta-visível (UV/Vis) a 254 nm.

A avaliação *in vitro* do complexo  $\text{TcL3}$  mostrou que se trata de um composto hidrofílico e estável face à oxidação aeróbia. O estudo de ligação à Hidroxiapatite permitiu concluir que a cinética de ligação do complexo  $\text{TcL3}$  à HA é muito rápida, atingindo um valor acima de 90% quando utilizamos 20 mg de HA.

Estudos de biodistribuição em ratinho *Balb-c* revelaram que o complexo  $\text{TcL3}$  apresenta uma elevada fixação óssea, com um longo tempo de permanência neste tecido. A maior acumulação no osso verifica-se às 4h *p.i.* (12,1% A.I./g órgão). No entanto, o facto de apresentar uma depuração sanguínea relativamente lenta, pode comprometer a sua utilização como sonda radioactiva para o diagnóstico de metástases ósseas. A depuração sanguínea relativamente lenta é devida, provavelmente, à elevada ligação às proteínas plasmáticas de  $\text{L}^3$ . O composto  $\text{TcL3}$  é excretado preferencialmente pela via renal.

A avaliação da estabilidade *in vivo* de  $\text{TcL3}$  revelou que o composto permanece intacto em circulação sanguínea, mesmo ao fim de 1h após administração. A análise da urina evidenciou a ausência de metabolitos, o que nos indica que o complexo  $\text{TcL3}$  é estável e não sofre metabolização *in vivo*. O facto de o complexo se manter intacto em circulação sanguínea, poderá ser uma mais valia na medida em que este poderá atingir o órgão/tecido alvo na forma química pretendida, potenciando a fixação óssea.

Apesar do complexo  $\text{TcL3}$  apresentar uma elevada fixação óssea, a sua lenta depuração sanguínea levou-nos a abandonar a hipótese de sintetizar o complexo análogo de  $^{188/186}\text{Re}$  para fins terapêuticos. Deste modo, futuramente deverá orientar-se o trabalho no sentido de avaliar biologicamente os complexos  $\text{TcL1}$  e  $\text{TcL2}$  e comparar o efeito da carga e do peso molecular na depuração sanguínea e na fixação óssea.

Uma outra estratégia a explorar será a síntese de compostos trifuncionais que contenham numa única entidade química, um ligando bifuncional (pirazolo-amina-pirazolo, pirazolo-diamina e pirazolo-aminocarboxilato), uma unidade bisfosfonato e um composto citostático (ex: docetaxel). Com estes compostos trifuncionais iriam preparar-se complexos de  $^{188}\text{Re}$  e avaliar o seu efeito terapêutico face à terapia combinada em utilização.

# Capítulo 4

## PARTE EXPERIMENTAL



## 4. Parte Experimental

### 4.1. Considerações Gerais

Todos os reagentes químicos e solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem qualquer purificação adicional, excepto quando expressamente indicado o contrário.

Os compostos sensíveis ao ar ou à humidade foram manuseados em atmosfera de  $N_2$ , recorrendo a técnicas de linha de vácuo/azoto e de técnicas de Schlenk e utilizando solventes secos e destilados.

O composto precursor *fac*- $[Re(CO)_3(H_2O)_3]Br$ , foi sintetizado de acordo com os métodos descritos na literatura.<sup>[51]</sup>

### 4.2. Preparação e Purificação de Solventes e Reagentes de Partida

#### 4.2.1. Solventes

Nas reacções de síntese que envolveram a utilização de solventes secos, os solventes utilizados foram secos e destilados em atmosfera de azoto de acordo com o procedimento descrito na literatura que a seguir se descreve de forma resumida.<sup>[61]</sup>

Os peneiros moleculares utilizados na secagem dos solventes foram activados por aquecimento à temperatura de 250°C em vazio durante 24 horas.

Os solventes destilados foram mantidos sob azoto e guardados sob peneiros moleculares 4 Å e 3 Å no caso do  $CH_3CN$ .

**Acetonitrilo:** pré-secagem com  $CaH_2$ , destilado em atmosfera inerte na presença de  $P_2O_5$  e colocado em contacto prolongado com peneiros moleculares 3Å.

**Diclorometano:** pré-secagem com  $CaCl_2$ , destilado em atmosfera inerte na presença de  $P_2O_5$  e mantido em contacto prolongado com peneiros moleculares 4Å.

**Tetrahidrofurano:** pré-secagem com peneiros moleculares 4Å e destilado em atmosfera inerte na presença de fio de sódio, utilizando benzofenona como indicador.

**Metanol:** pré-secagem com peneiros moleculares 4Å e destilado em atmosfera inerte na presença de magnésio metálico e de iodo molecular. Mantido em contacto permanente com peneiros moleculares 4Å.

**Trietilamina:** destilada de peneiros moleculares 4Å em atmosfera inerte e conservada em peneiros moleculares 4Å.

#### 4.2.2. Reagentes

Para além dos solventes e reagentes que foram utilizados nas reacções após purificação, foram também utilizados nas reacções de síntese reagentes que foram adquiridos comercialmente e não foram submetidos a nenhuma purificação prévia.

### 4.3. Técnicas de Purificação e Caracterização Química dos Compostos Sintetizados

#### Cromatografia em camada fina (TLC)

A cromatografia em camada fina (TLC) foi utilizada para seguir as reacções de síntese química e para identificar os produtos da reacção. Foram usadas placas de sílica-gel Merck 60 F<sub>254</sub> com 0,25 mm de espessura. A composição do eluente é mencionada para cada um dos compostos, sendo ainda dada a proporção volumétrica dos vários componentes.

Foi efectuada a localização e visualização das manchas dos compostos por irradiação das placas cromatográficas com luz ultravioleta numa câmara Spectroline ENF-240C/FE a comprimento de onda 254 nm, por revelação com vapor de iodo ou com reagente de Dittmer. A detecção de compostos com bisfosfonatos foi realizada com o reagente de Dittmer.

#### *a) Preparação do Reagente de Dittmer* <sup>[55]</sup>:

**Solução I:** Uma mistura de óxido molibdico (4 g) em ácido sulfúrico concentrado (100 ml) foi fervida, com agitação contínua, até à dissolução completa dos reagentes.

**Solução II:** À solução I (50 ml) foi adicionado molibdénio em pó (0,180 g) que foi dissolvido com aquecimento.

**Solução III:** Após arrefecimento das soluções anteriores, adiciona-se 50 ml de cada uma das soluções I e II. Esta solução permanece estável pelo menos durante um ano num recipiente fechado.

#### *b) Utilização do Reagente de Dittmer:*

A detecção de compostos com bisfosfonatos foi realizada utilizando a solução III (2,5 ml) diluída com água destilada (5 ml) e etanol (7,5 ml). As tiras de TLC foram levemente humedecidas por vaporização uniforme com esta solução. Após aquecimento (100 °C) as manchas dos compostos com bisfosfonatos apareciam com uma cor azul escura que aumentava de intensidade durante o arrefecimento até à temperatura ambiente após 10 a 15 min. A cor de fundo azul escura desaparece totalmente e aparecem as manchas azuis intensas.

### Cromatografia em Coluna

A cromatografia em coluna foi utilizada para isolar e purificar alguns dos compostos sintetizados.

A purificação por cromatografia em coluna foi realizada em colunas de vidro de dimensões variadas utilizando sílica-gel 60 Merck de granulometria 0,060 mesh. Os eluentes foram escolhidos de acordo com o composto a purificar. Após a aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi efectuada por acção da gravidade e os compostos recolhidos em fracções com volume adequado. As fracções recolhidas foram analisadas por TLC ou HPLC de modo a identificar as que continham o produto pretendido. As fracções que continham o composto puro foram misturadas e secas sob vácuo numa linha de vazio ou num evaporador rotativo Buchi R-200.

### Cromatografia instantânea de camada fina - sílica gel (ITLC-SG)

A cromatografia instantânea de camada fina foi utilizada para seguir a cinética e a eficiência das reacções de síntese dos complexos radioactivos. Foram utilizadas tiras de sílica-gel (Polygram, Macherey-Nagel). Os sistemas cromatográficos utilizados foram MeOH/HCl 6N (95/5) e Acetona (100%).

A distribuição da radioactividade nas tiras foi analisada utilizando um detector Berthold LB 505 acoplado a um radiocromatógrafo. Parâmetros de análise: velocidade de 1200 mm/h, às escalas de 100 k e 300 k.

### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi usada para efeitos de purificação e controlo analítico de compostos orgânicos, dos complexos de Re, e dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$ .

A análise dos compostos descritos foi efectuada num sistema de HPLC constituído por uma bomba Perkin-Elmer LC 200, um detector UV/Vis Shimadzu SPD-10 AV e um detector de radiação Berthold LB-507A ou Berthold 509, ligados em série. Todos os solventes utilizados eram de qualidade HPLC. A água utilizada para preparação dos solventes aquosos foi bidestilada em aparelho de quartzo Fiestreen Cyclon. Os solventes e a água foram filtrados por filtros Milipore de 0,22  $\mu\text{m}$  e desaerificados com hélio. As condições experimentais foram seleccionadas de acordo com as características dos compostos a analisar e/ou purificar e serão referidas sempre que oportuno para cada um dos compostos em particular. Os perfis cromatográficos, UV-Vis e radioactivo, foram obtidos por detecção da sua absorvância a 220 nm ou 254 nm e/ou por detecção da radiação  $\gamma$ .

*Condições cromatográficas usadas na análise do composto 2, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> e L<sup>3</sup> descritos no capítulo 2:*

**Coluna:** EC-Nucleosil 100 C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4 mm)

**Fluxo:** 1 mL/min

**Eluentes:** (A)- Solução aquosa de TFA 0,1%; (B) -  $\text{CH}_3\text{CN}$ /TFA 0,1%

**Métodos:** Na análise dos compostos 2, L<sup>1</sup> e L<sup>3</sup> utilizou-se a sequência de eluição do método 1 enquanto na análise do ligando L<sup>2</sup> foi utilizada a sequência de eluição do método 2.

Na sequência de eluição, utilizando os métodos 1 e 2, os gradientes utilizados foram os descritos a seguir.

**Método 1:**

Passo	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B	Curve
1	5	100	0	0,0
2	15	5	95	1,0
3	0,1	0	100	1,0
4	9,9	0	100	0,0

**Método 2:**

Passo	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B	Curve
1	5	100	0	0,0
2	15	40	60	1,0
3	5	40	60	0,0
4	5	0	100	1,0

*Condições cromatográficas usadas na análise dos compostos **ReL1** e **ReL3** descritos no capítulo 2:*

**Coluna:** EC-Nucleosil 100 C18 (10 µm, 250 mm x 4 mm)

**Fluxo:** 1 mL/min

**Eluentes:** (A)- Solução aquosa de TFA 0,5%; (B) - CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,5%

**Métodos:** Na análise dos **ReL1** e **ReL3** utilizou-se a sequência de eluição do método 3.

Na sequência de eluição, utilizando os método 3, os gradientes utilizados foram os descritos a seguir.

**Método 3:**

Passo	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B	Curve
1	3	100	0	0,0
2	0,1	75	25	1,0
3	5,9	75	25	0,0
4	0,1	66	34	1,0
5	10	0	100	1,0
6	5	0	100	0,0
7	0,1	100	0	1,0
8	4,9	100	0	0,0

Os cromatogramas dos compostos não radioactivos foram todos obtidos monitorizando a absorção de UV a  $\lambda = 254$  nm ou a  $\lambda = 220$  nm.



### Purificação utilizando cartuchos Sep Pak C18

A purificação de alguns compostos contendo bisfosfonatos foi realizada utilizando cartuchos Sep Pak de fase reversa C18 (Waters Co., 12 cc/2 g ou 0,85 cc/360 mg) pré-condicionados de acordo com o protocolo do fabricante. Isto é, os cartuchos são previamente lavados primeiro com metanol (10 ml, para os de 12 cc/2 g ou 2 ml, para os de 0,85 cc/360 mg) e depois com H<sub>2</sub>O (50 ml, para os de 12 cc/2 g ou 5 ml, para os de 0,85 cc/360 mg). A eluição é feita utilizando um gradiente de metanol/H<sub>2</sub>O, começando com H<sub>2</sub>O, utilizando posteriormente misturas de metanol/H<sub>2</sub>O (20 - 100%). A presença de compostos contendo bisfosfonatos foi monitorizada por TLC, utilizando o reagente de Dittmer como agente de revelação.

### Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P e <sup>13</sup>C foram realizados num espectrómetro Varian Unity Inova-300, com uma frequência de ressonância de 300 MHz para o <sup>1</sup>H, de 121,5 MHz para o <sup>31</sup>P e de 75,5 MHz para o <sup>13</sup>C, à temperatura ambiente.

Os solventes deuterados utilizados foram o CD<sub>3</sub>OD, o CDCl<sub>3</sub>, e D<sub>2</sub>O. Os desvios químicos são apresentados em ppm. Os desvios químicos dos sinais de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram medidos utilizando como referência interna o desvio químico residual do solvente relativamente ao tetrametilsilano [CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm): 7,24 (1H); 77,0 (<sup>13</sup>C)] e [CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm): 3,30 (<sup>1</sup>H); 49,0 (<sup>13</sup>C)]. Os desvios químicos dos sinais de <sup>13</sup>C, das amostras dissolvidas em D<sub>2</sub>O, foram obtidos usando como referência externa uma solução de 1,4-dioxano (90 %) [δ (ppm): 69,2]. Os desvios químicos dos sinais de <sup>31</sup>P foram obtidos usando como referência externa uma solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) [δ (ppm): 0,00].

### Espectroscopia de Infra Vermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos num espectrómetro Bruker, Tensor 27, para amostras preparadas em pastilhas de KBr.

### Espectrometria de Massa

Os espectros de massa (ESI-MS) foram obtidos num espectrómetro de massa ESI/QITMS Bruker HCT, pelo Doutor Joaquim Marçalo. O equipamento QITMS foi adquirido com o apoio do Programa Nacional de Reequipamento Científico (contrato rede/1503/REM/2005 - ITN) da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e é parte integrante da RNEM - Rede Nacional de Espectrometria de Massa. Os dados adquiridos em cada espectro são indicados pela seguinte ordem: fórmula molecular do ião molecular, Encontrada: razão massa/carga - m/z Calculada: m/z.

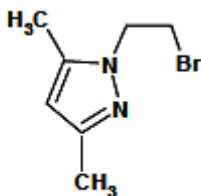
### Medição da Actividade das Soluções Radioactivas

A actividade das soluções de <sup>99m</sup>Tc foi medida numa câmara de ionização (*Aloka, Curiemeter IGC-3*, Tokyo, Japan). As amostras com menor actividade foram medidas num contador gama (*Berthold, LB2111*, Germany).

## 4.4. Síntese dos Ligandos

### 4.4.1. Síntese de Compostos Orgânicos intermediários

#### 4.4.1.1. Síntese do 1-(2-Bromoetil)-3,5-dimetil-1H-pirazolo<sup>[56]</sup> (1)

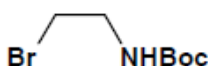


A uma solução de 3,5-dimetilpirazolo (4,998 g; 52 mmol) em 1,2-dibromoetano (44,81 mL; 520 mmol) foi adicionada uma solução aquosa de NaOH 40% (15,6 mL; 156 mmol) e ainda brometo de tetrabutilamônio (TBAB) (0,432g; 1,30 mmol). A mistura resultante foi refluxada durante 1h.

Após arrefecer à temperatura ambiente, procedeu-se à separação das fases. A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e evaporada a pressão reduzida. O produto foi posteriormente purificado por cromatografia em coluna (eluente: acetato de etilo), obtendo-se um óleo amarelo. Rendimento: 2,084 g (42%)

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)):  $\delta_{\text{H}}$  2,18 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,23 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 3,65 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{-Br}$ ); 4,28 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{-pz}$ ); 5,76 (1H, s, H(4)-pz)

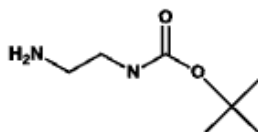
#### 4.4.1.2. Síntese do N-terc-Butoxicarbonilo-2-bromoetilamina,<sup>[57]</sup> (9)



A uma solução de 2-bromoetilamina (1,000g; 4,88 mmol) em metanol seco (8 mL) adicionou-se  $\text{NEt}_3$  seca (1,36 mL; 9,86 mmol) e dicarbonato de di-terc-butil-carbonilo (1,278 g; 5,86 mmol). Deixou-se reagir à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ficou um sólido branco. Lavou-se o resíduo com água destilada e fez-se uma extracção com acetato de etilo (3 x). A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$ . Procedeu-se de seguida à filtração e evaporação do solvente - *formação de um óleo amarelo*. Rendimento: 890 mg (89%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)):  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (9H, s, BOC); 3,44 (4H, m,  $2\text{CH}_2$ ); 4,97 (1H, bs, NH)

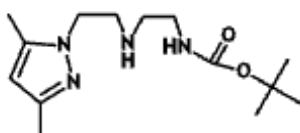
#### 4.4.1.3. Síntese do *terc*-butil-2-aminoetilcarbamato<sup>[58]</sup> (3)



A uma solução de dicarbonato de di-*terc*-butilo (15,00 g; 69,00 mmol) em dioxano (90 mL) foi adicionada, durante 2,5 h, gota a gota e a 0 °C, uma solução de 1,2-diaminoetano (37 mL, 552,0 mmol) em dioxano (100 mL). A reacção foi deixada à temperatura ambiente em agitação constante durante 22 h, sob N<sub>2</sub>. Seguidamente evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Após remoção do solvente extraiu-se o resíduo com H<sub>2</sub>O, filtrou-se e desprezou-se o sólido (produto bis-substituído). Extraíu-se a solução aquosa com CHCl<sub>3</sub>, filtrou-se a fase orgânica, secou-se com MgSO<sub>4</sub> e evaporou-se, obtendo-se um óleo amarelo pálido (3). Rendimento: 10,69 g (96%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): δ<sub>H</sub> 1,18 (2H, bs, NH<sub>2</sub>); 1,36 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 2,70 (2H, t, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,09 (2H, m, CH<sub>2</sub>-NHBOC); 5,04 (1H, bs, NH).

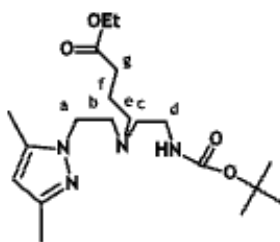
#### 4.4.1.4. Síntese do *terc*-butil-2-[2(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etilamino]etilcarbamato<sup>[59]</sup> (4)



A uma solução de **1** (1,000 g, 4,86 x 10<sup>-3</sup> mol) e **3** (1,18 g, 0,006 mol) em acetonitrilo seco (6 mL) foi adicionado K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,02 g, 0,007 mol) e KI (0,04 g, 2,4 x 10<sup>-4</sup> mol). A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura de refluxo durante a noite em atmosfera de azoto. No dia seguinte, a mistura reaccional foi filtrada para retirar o precipitado de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e o solvente foi removido. O sólido resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (eluente: clorofórmio 100%). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo pálido (4). Rendimento: 334 mg (33%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): 1,39 (s, 9H); 2,17 (s, 3H); 2,19 (s, 3H); 2,68 (t, 2H); 2,95 (t, 2H); 3,14 (m, 2H); 4,01 (t, 2H); 5,10 (s, 1H); 5,74 (s, 1H).

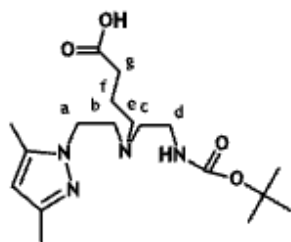
#### 4.4.1.5. Síntese do 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino) propanoato de etilo, <sup>[59]</sup> (5)



A uma solução de **4** (334 mg; 1,18 mmol) em CH<sub>3</sub>CN seco (4 mL) adicionou-se 350 µL de 4-bromobutirato de etilo (2,45 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,323 g; 2,34 mmol) e KI (9,7 mg; 0,06 mmol). Deixou-se esta mistura em refluxo durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente filtrou-se com celite, a fim de remover o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo, com gradiente de 50/50 a 100/0). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 208 mg (63%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): δ<sub>H</sub> 1,22 (3H, t, CH<sub>3</sub>-éster); 1,41 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,59 (2H, t, CH<sub>2</sub>(f)); 1,85 (1H, bs, NH); 2,13 (2H, m, CH<sub>2</sub> (e)); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,42 (2H, t, CH<sub>2</sub> (b)); 2,49 (2H, t, CH<sub>2</sub> (c)); 2,74 (2H, t, CH<sub>2</sub> (d)); 3,05 (2H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 3,95 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 4,09 (2H, q, CH<sub>2</sub>-éster); 5,33 (1H, bs, NH); 5,73 (1H, s, H(4)-pz).

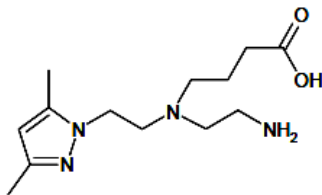
#### 4.4.1.6. Síntese do Ácido 3-((2-(3,5-dimetilpirazolil)etil)-(2-(terc-butoxicarbonilamino)etil)amino)propanóico <sup>[59]</sup> (6)



Uma solução de NaOH (210 mg; 5,25 mmol) em H<sub>2</sub>O (5 mL) foi adicionada a uma solução de **5** (208 mg; 0,52 mmol) em THF (6 mL) e a mistura foi refluxada durante a noite. A mistura reaccional foi neutralizada com HCl 12 N em banho de gelo. Seguidamente os solventes foram evaporados e o resíduo seco foi extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O solvente foi removido sob vácuo e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel (eluente: CHCl<sub>3</sub>/MeOH, com gradiente de 90/10 a 50/50). O composto foi recuperado após evaporação do solvente das fracções recolhidas sob a forma de um óleo amarelo. Rendimento: 164 mg (79%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)): δ<sub>H</sub> 1,39 (9H, s, 3-CH<sub>3</sub> (BOC)); 1,71 (2H, t, CH<sub>2</sub> (f)); 2,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,34 (2H, t, CH<sub>2</sub> (e)); 2,48 (4H, m, CH<sub>2</sub> (b) + CH<sub>2</sub> (c)); 2,74 (2H, t, CH<sub>2</sub> (d)); 3,01 (2H, m, CH<sub>2</sub> (g)); 4,02 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 4,53 (1H, bs, NH); 4,84 (1H, s, H(4)-pz).

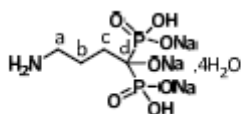
#### 4.4.1.7. Síntese do Ácido 4-{(2-aminoetil)[2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)etil]amino}butanóico (7)



O composto **6** (164 mg, 0,45 mmol) foi dissolvido em diclorometano (8 ml). Foi adicionado à solução ácido trifluoroacético (2 ml, 26 mmol) e a mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente, com agitação, durante 2 h. Em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em água e neutralizado com NaOH 1N. A água foi evaporada sob vácuo e o óleo obtido foi extraído para um pequeno volume de metanol. Os sólidos foram removidos por filtração e o produto foi seco a pressão reduzida. Rendimento: 158 mg (96%).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm):  $\delta_{\text{H}}$  1,88 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 2,20 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,29 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2,36 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ); 3,09 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ); 3,30 (6H, m, 3 $\text{CH}_2$ ); 4,34 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ); 5,95 (1H, s, H(4)-pz).

#### 4.4.1.8. Síntese do Alendronato (ALN) <sup>[50]</sup> (8)



Num balão de 250 mL de 3 tubuladuras equipado com um condensador de refluxo e uma ampola de adição, sob atmosfera de azoto, adicionaram-se 4g (38,8 mmol) de ácido 4-aminobutírico, 3,2 g (38,8 mmol) de  $\text{H}_3\text{PO}_3$  e 16 mL de ácido metanosulfónico. A mistura foi aquecida a 65 °C durante alguns minutos e adicionou-se  $\text{PCl}_3$  gota-a-gota durante aproximadamente 30 min. A mistura manteve-se a 65°C durante a noite. No dia seguinte deixou-se arrefecer a mistura até à temperatura ambiente. Adicionaram-se 40 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  arrefecida a 0 - 5 °C, com agitação vigorosa. Adicionaram-se mais 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e refluxou-se durante 5 h. Ao fim desse tempo arrefeceu-se a mistura reaccional até à temperatura ambiente e ajustou-se o pH a 4-5 com adição de uma solução aquosa de NaOH (50%). A mistura reaccional ficou durante a noite no congelador, e no dia seguinte separou-se o composto sob a forma de precipitado branco lavado com 2x10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  e 20 ml de etanol. Alendronato (pH = 4 - 5): (11,00 g, Rendimento: 87 %)

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  (ppm)): 2,88 (2H, s largo,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 1,85 (4H, s largo,  $\text{CH}_2(\text{b}) + \text{CH}_2(\text{c})$ ).

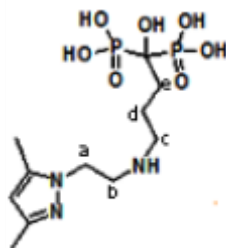
RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  (ppm)): 18,14.

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  (ppm)): 75,5 (C(d)-OH, t,  $J_{\text{C-P}} = 135$  Hz), 41,9 (s,  $\text{CH}_2(\text{a})$ ); 32,5 (s,  $\text{CH}_2(\text{b})$ ); 24,2 (t,  $J_{\text{C-P}} = 7$  Hz,  $\text{CH}_2(\text{c})$ -COH).

Análise elementar C,H,N (%) para  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NNa}_3\text{O}_7\text{P}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : Calculada: C 14,78 %; H 5,58 %; N 4,31 %.

Experimental: C 14,79 %; H 7,23 %; N 4,50 %.

4.4.1.9. Síntese do 4-(2-(3,5-dimetil-1H-pirazolo-1-il)etilamina)-1-hidroxibutano-1,1-ácido diildifosfónico (2)



Num balão de 50 mL colocaram-se 330 mg de ALN (**8**) (0,85 mmol) e 346 mg de N-(2-Bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (**1**) (1,7 mmol). Adicionaram-se 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada e ajustou-se o pH a aproximadamente 12 com uma solução de NaOH 3 M. A mistura reaccional ficou em refluxo durante 48 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente a mistura reaccional foi purificada numa coluna Sep-Pack C18. Antes da aplicação da mistura reaccional a coluna foi previamente lavada com MeOH e H<sub>2</sub>O destilada (3 x alternadamente). Após equilibrar a coluna a mistura foi então aplicada e purificada (eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O, com gradiente de 0/100 a 100/0). As fracções cujo resultado para o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do MeOH as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 107 mg (32%).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 1,74 (4H, m, CH<sub>2</sub> (d) + CH<sub>2</sub>(e) ); 2,03 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,12 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,66 (2H, t, CH<sub>2</sub> (c)); 3,02 (2H, t, CH<sub>2</sub> (b)); 4,05 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 5,82 (1H, s, H(4)-pz).

**RMN <sup>31</sup>P** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 18,69

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm): 149,4 [C(3/5)pz]; 142,0 [C(3/5)pz]; 105,5 [C(4)pz]; 74,1 (C-OH); 49,2 (CH<sub>2</sub>); 47,6 (CH<sub>2</sub>); 45,9 (CH<sub>2</sub>); 31,7 (CH<sub>2</sub>); 23,1 (CH<sub>2</sub>); 12,3 (CH<sub>3</sub>); 10,2 (CH<sub>3</sub>)

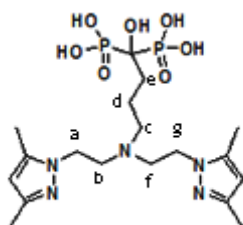
**Tempo de retenção (RP-HPLC):** 11,0 min (Nucleosil 100-10 C18; 1 mL/min; Eluentes: A - solução aquosa de TFA 0,1 %; B - CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1%).

**ESI-MS [+]:** valor calculado para C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>Na<sub>3</sub> [M + 3Na - 2H]<sup>+</sup> : 438,2; valor experimental: 438,1

**ESI-MS [-]:** valor calculado para C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> [M - H]<sup>-</sup> : 370,2; valor experimental: 370,0 ; valor calculado para C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>Na [M - 2H+Na]<sup>-</sup> : 392,2; valor experimental: 392,1

#### 4.4.2. Síntese dos Ligandos Finais

##### 4.4.2.1. Síntese de 4-(bis(2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)amino)-1,1-diylidiphosphonic acid ( $L^1$ )



Num balão de 50 mL colocaram-se 330 mg de ALN (**8**) (0,85 mmol) e 1,0 g de N-(2-Bromoetil)-3,5-dimetilpirazolo (**1**) (5 mmol). Adicionaram-se 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 4 mL de THF e ajustou-se o pH a 12 com uma solução de NaOH 3 M. A mistura reaccional ficou em refluxo durante 4 dias. Após arrefecimento à temperatura ambiente a mistura reaccional foi purificada numa coluna Sep-Pack C18. Antes da aplicação da mistura reaccional a coluna foi previamente lavada com MeOH e H<sub>2</sub>O destilada (3 x alternadamente). Após equilibrar a coluna a mistura foi então aplicada e purificada (eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O, com gradiente de 0/100 a 100/0). As fracções cujo resultado para o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do MeOH as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 60%

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O,  $\delta$  (ppm)): 1,72 (4H, m, CH<sub>2</sub> (d) + CH<sub>2</sub>(e)); 2,03 (6H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,10 (6H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,54 (2H, t, CH<sub>2</sub> (c)); 2,78 (4H, t, CH<sub>2</sub> (b)/CH<sub>2</sub> (f)); 3,95 (4H, t, CH<sub>2</sub> (a)/CH<sub>2</sub> (g)); 5,78 (1H, s, H(4)-pz).

**RMN <sup>31</sup>P** (D<sub>2</sub>O,  $\delta$  (ppm)): 18,70

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O,  $\delta$  (ppm)): 149,0 [C(3/5)pz]; 141,7 [C(3/5)pz]; 105,2 [C(4)pz]; 74,2 (C-OH); 54,5 (CH<sub>2</sub>); 52,7 (CH<sub>2</sub>); 45,4 (CH<sub>2</sub>); 32,0 (CH<sub>2</sub>); 20,9 (CH<sub>2</sub>); 12,2 (CH<sub>3</sub>); 10,3 (CH<sub>3</sub>)

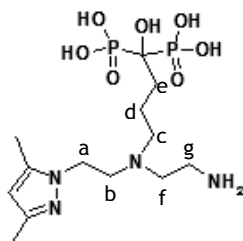
**IV (KBr):** ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 1676, 1551, 1177, 1119, 1055

**Tempo de retenção (RP-HPLC):** 14,0 min (Nucleosil 100-10 C18; 1 mL/min; Eluentes: A - solução aquosa de TFA 0,1 %; B - CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1%).

**ESI-MS [+]:** valor calculado para C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> [M + 2Na - H]<sup>+</sup> : 538,4; valor experimental: 538,3

**ESI-MS [-]:** valor calculado para C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub> [M - H]<sup>-</sup> : 493,4; valor experimental: 492,2; valor calculado para C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P<sub>2</sub>Na [M - 2H+Na]<sup>-</sup> : 514,4; valor experimental: 514,1

#### 4.4.2.2. Síntese de 4-((2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)amino)-1-hydroxybutane-1,1-diylidiphosphonic acid (L<sup>2</sup>)



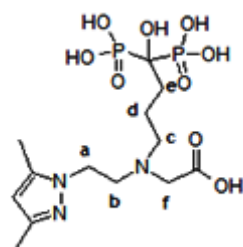
A uma solução de **2** (50 mg, 0,13 mmol) em água H<sub>2</sub>O destilada (2mL) adicionou-se o composto **9** (90,4 mg, 0,40 mmol). À mistura anterior juntou-se 200 µL de uma solução de NaOH 3 M e ajustou-se o pH (pH = 12 - 13). A mistura reaccional ficou em refluxo durante 5 dias. Após arrefecimento à temperatura ambiente a mistura reaccional foi purificada numa coluna Sep-Pack C18. Antes da aplicação da mistura reaccional a coluna foi previamente lavada com MeOH e H<sub>2</sub>O destilada (3 x alternadamente). Após equilibrar a coluna a mistura foi então aplicada e purificada (eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O, com gradiente de 0/100 a 100/0). As fracções cujo resultado para o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do MeOH as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó ligeiramente amarelado. Rendimento: 11 mg (22%). *Nota: Após análise por RMN verificou-se que o composto não estava completamente puro.*

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 1,80 (4H, m, CH<sub>2</sub> (d) + CH<sub>2</sub>(e) ); 2,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,14 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,86 (4H, m, CH<sub>2</sub>(c) + CH<sub>2</sub>(f)); 3,16 (2H, t, CH<sub>2</sub> (b)); 3,61 (2H, t, CH<sub>2</sub> (g)); 4,12 (2H, t, CH<sub>2</sub> (a)); 5,84 (1H, s, H(4)-pz).

**RMN <sup>31</sup>P** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 18,47

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 151,5 [C(3/5)pz]; 143,9 [C(3/5)pz]; 107,5 [C(4)pz]; 73,2 (C-OH); 61,4 (CH<sub>2</sub>); 50,9 (CH<sub>2</sub>); 49,2 (CH<sub>2</sub>); 45,2 (CH<sub>2</sub>); 43,5 (CH<sub>2</sub>); 33,3 (CH<sub>2</sub>); 24, (CH<sub>2</sub>); 14,2 (CH<sub>3</sub>); 12,0 (CH<sub>3</sub>)

#### 4.4.2.3. Síntese de 2-((2-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)ethyl)(4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl)amino)acetic acid (L<sup>3</sup>)



A uma solução de **2** (60 mg, 0,16 mmol) em água H<sub>2</sub>O destilada (2mL) adicionou-se Ácido Bromoacético (27 mg, 0,19 mmol). À mistura anterior juntou-se 200 µL de uma solução de NaOH 3 M e ajustou-se o pH (pH = 12 - 13). A mistura reaccional ficou em refluxo durante a noite. Após



arrefecimento à temperatura ambiente a mistura reaccional foi purificada numa coluna Sep-Pack C18. Antes da aplicação da mistura reaccional a coluna foi previamente lavada com MeOH e H<sub>2</sub>O destilada (3 x alternadamente). Após equilibrar a coluna a mistura foi então aplicada e purificada (eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O, com gradiente de 0/100 a 100/0). As fracções cujo resultado para o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do MeOH as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 42 mg (70%).

**RMN <sup>1</sup>H** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 1,72 (4H, m, CH<sub>2</sub>(d) + CH<sub>2</sub>(e) ); 2,00 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,10 (3H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,72 (2H, t, CH<sub>2</sub> (c)); 3,04 (2H, t, CH<sub>2</sub> (b)); 3,21 (2H, s, CH<sub>2</sub> (f)); 4,08 (2H, s, CH<sub>2</sub> (a)); 5,79 (1H, s, H(4)-pz).

**RMN <sup>31</sup>P** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 18,69

**RMN <sup>13</sup>C** (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 177,8 (C=O); 149,1 [C(3/5)pz]; 141,7 [C(3/5)pz]; 105,5 [C(4)pz]; 74,0 (C-OH); 57,3 (CH<sub>2</sub>); 55,2 (CH<sub>2</sub>); 53,1 (CH<sub>2</sub>); 45,3 (CH<sub>2</sub>); 31,8 (CH<sub>2</sub>); 21,2 (CH<sub>2</sub>); 12,2 (CH<sub>3</sub>); 10,2 (CH<sub>3</sub>)

**IV (KBr)**: (ν/cm<sup>-1</sup>) 11345, 1261 e 1685

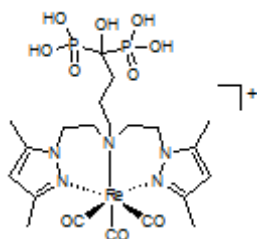
**Tempo de retenção (RP-HPLC)**: 15,0 min (Nucleosil 100-10 C18; 1 mL/min; Eluentes: A - solução aquosa de TFA 0,1 %; B - CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1%).

**ESI-MS [+]**: valor calculado para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>Na<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 518,2 ; valor experimental 518,0. Valor

**ESI-MS [-]**: valor calculado para C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub> [M - H]<sup>-</sup> : 428,3; valor experimental: 428,8; valor calculado para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>Na<sub>2</sub> [M - 3H + 2Na]<sup>-</sup> : 472,2; valor experimental: 472,1

## 4.5. Síntese dos Complexos de Rénio

### 4.5.1. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>L<sup>3</sup>)] (ReL<sup>1</sup>)



A uma solução de L<sup>1</sup> (pH=8,96) (0,015 g; 0,026 mmol) em D<sub>2</sub>O (1 mL), ajustou-se o pH a 7 usando soluções de DCl e KOD (pH<sub>final</sub>= 7,01). Analisou-se e traçou-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P. Em seguida, adicionou-se *fac*-[Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]Br (0,013 g, 0,032 mmol) e mediu-se o pH (pH<sub>final</sub>= 7,40). A mistura reaccional foi aquecida à temperatura de 80°C e analisada por RMN ao longo do tempo, tendo ficado em reacção durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi aplicada directamente numa coluna Sep-Pack C18 e purificada (eluente: TFA 0,1%<sub>(aq)</sub> / CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,1% com gradiente de 100/0, 25/75, 50/50 e 0/100). ). As fracções cujo resultado para

o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do CH<sub>3</sub>CN as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 2 mg (13%).

RMN <sup>1</sup>H (MeOD, δ (ppm)): 1,97 (4H, m, 2CH<sub>2</sub>-ALN); 2,05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 2,14 (6H, s, CH<sub>3</sub>-pz); 3,06 (2H, m, CH<sub>2</sub>-ALN ); 3,29 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 3,58 (2+2H, m, 4 HC-H); 4,38 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 5,95 (2H, s, H(4)-pz).

RMN <sup>31</sup>P (MeOD, δ (ppm)): 23,03

RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, δ (ppm)): 199,2, 198,5 (C≡O); 149,4 [C(3/5)pz]; 141,8 [C(3/5)pz]; 105,0 [C(4)pz]; 54,4 (CH<sub>2</sub>); 52,5 (CH<sub>2</sub>); 43,7 (CH<sub>2</sub>); 32,6 (CH<sub>2</sub>); 20,0 (CH<sub>2</sub>); 12,3 (CH<sub>3</sub>); 10,3 (CH<sub>3</sub>)

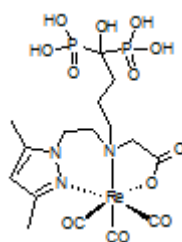
IV (KBr): (ν/cm<sup>-1</sup>) 2020, 1820, 1617

Tempo de retenção (RP-HPLC): 15,5 min (Nucleosil 100-10 C18; 1 mL/min; Eluentes: A - solução aquosa de TFA 0,5 %; B - CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,5%).

ESI-MS [+]: valor calculado para C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>Re [M + H]<sup>+</sup> 765,1 ; valor experimental 765,3.

ESI-MS [-]: valor calculado para C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub>Re [M - H]<sup>-</sup> 763,1; valor experimental 763,2.

#### 4.5.1. Síntese do complexo *fac*-[Re(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>L<sup>1</sup>) (ReL<sup>3</sup>)



A uma solução de L<sup>3</sup> (pH=9,56) (0,011 g; 0,018 mmol) em D<sub>2</sub>O (600 μL) , ajustou-se o pH a 4 usando soluções de DCl de diferentes concentrações (pH<sub>final</sub>= 4,09). Analisou-se e traçou-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P. Em seguida, adicionou-se *fac*-[Re(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]Br (0,007 g, 0,017 mmol) e mediu-se o pH (pH<sub>final</sub>= 6,00). A mistura reaccional foi aquecida à temperatura de 80°C e analisada por RMN ao longo do tempo, tendo ficado em reacção durante a noite. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura foi aplicada directamente numa coluna Sep-Pack C18 e purificada (eluente: MeOH/H<sub>2</sub>O, com gradiente de 10/90, 25/75, 50/50 e 100/0). ). As fracções cujo resultado para o Reagente Dittmer foi positivo (cor azul) foram analisadas por HPLC. Após a evaporação do MeOH as fracções foram liofilizadas durante a noite. O composto foi obtido na forma de um pó branco. Rendimento: 3 mg (27%).

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  (ppm)): 1,80 (4H, m,  $2\text{CH}_2\text{-ALN}$ ); 2,13 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,29 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-pz}$ ); 2,5-2,3 (1H, m, CH); 3,06-3,3 ( $2+2\text{H}$ , m,  $\text{CH}_2+2\text{ HC-H}$ ); 3,78-3,73 (1H, m, CH); 4,20 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ); 5,99 (1H, s, H(4)-pz).

**RMN  $^{31}\text{P}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  (ppm)): 18,32

**IV (KBr)**: ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ ) 2026, 1891  $\text{cm}^{-1}$

**Tempo de retenção (RP-HPLC)**: 10,6 min (Nucleosil 100-10 C18; 1 mL/min; Eluentes: A - solução aquosa de TFA 0,5 %; B -  $\text{CH}_3\text{CN/TFA}$  0,5%).

**ESI-MS [+]**: valor calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{P}_2\text{ReNa}_3$   $[\text{M} + 3\text{Na} - 2\text{H}]^+$  : 766,5 ; valor experimental 766,1

**ESI-MS [-]**: valor calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{P}_2\text{Re}$   $[\text{M} - \text{H}]^-$  698,0; valor experimental 698,1; valor calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{P}_2\text{ReNa}$   $[\text{M} + \text{Na} - \text{H}]^-$  : 720,0; valor experimental 720,1.

#### 4.6. Preparação de compostos Radioactivos - Síntese dos Complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc(I)}$

A manipulação das soluções radioactivas de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi efectuada em condições de protecção e segurança radiológica, com luvas de protecção e barreira de chumbo com visor de vidro impregnado de sais de chumbo. Os frascos que continham as soluções radioactivas foram colocados dentro de contentores de chumbo de espessura adequada à actividade da amostra. O pertecnetato de sódio,  $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ , foi obtido por eluição de um gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Amersham, Mallinkrodt ou MDS Nordion S.A) com uma solução de  $\text{NaCl}$  0,9%. A actividade do  $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$  eluído foi medida numa câmara de ionização Atomlab 100 plus (Biodex Medical Systems). Todos os frascos e soluções utilizados na síntese dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foram previamente purgados com azoto.

##### *Preparação do precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$*

A preparação da solução de  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  foi obtida pela marcação de um kit Isolink® da Mallinkrodt seguindo as instruções do fabricante. Num frasco Isolink® introduziu-se 2,5 mL de solução salina de  $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ . A mistura foi aquecida num banho termostaticado a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos e, após arrefecimento, foi adicionada uma solução de  $\text{HCl}$  1M para baixar o valor de pH até 7 (para marcação de  $\text{L}^1$ ) ou 4 (para o ligando  $\text{L}^3$ ). Depois de arrefecida a mistura foi analisada por HPLC.

O controlo de pureza radioquímica do precursor foi efectuada por HPLC de fase reversa, utilizando uma coluna analítica (EC 250/4 Nucleosil 100-10-C18, Macherey Nagel), com um fluxo de 1,0 mL/min e detecção  $\gamma$  (eluentes: A - solução aquosa TFA (0,5%); B -  $\text{CH}_3\text{CN/TFA}$  0,5%).

( $t_r$ =6,5 minutos); Rendimento radioquímico >95%.

### *Preparação do complexo fac-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-L<sup>1</sup>)] descrito no capítulo 2*

Num frasco de vidro capsulado e purgado com azoto introduziu-se uma solução de ligando 10<sup>-2</sup> M (100 µL) e uma solução de fac-[<sup>99m</sup>Tc(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (11,85 mCi) a pH 4 (1900 µl). A mistura foi aquecida num banho termostatzado a 100°C durante 45 minutos. A determinação do rendimento de marcação e avaliação da pureza radioquímica foi avaliada por HPLC de fase reversa (t<sub>R</sub>= 15,70 min).

Os complexos de <sup>99m</sup>Tc foram caracterizados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos de Re (t<sub>R</sub>= 15,52 min).

### *Preparação do complexo fac-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(κ<sup>3</sup>-L<sup>3</sup>)] descrito no capítulo 2*

Num frasco de vidro capsulado e purgado com azoto introduziu-se uma solução de ligando 10<sup>-2</sup> M (100 µL) e uma solução de fac-[<sup>99m</sup>Tc(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (11,85 mCi) a pH 4 (1900 µl). A mistura foi aquecida num banho termostatzado a 100°C durante 45 minutos. A determinação do rendimento de marcação e avaliação da pureza radioquímica foi avaliada por HPLC de fase reversa (t<sub>R</sub>= 10,60 min).

Os complexos de <sup>99m</sup>Tc foram caracterizados por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos de Re (t<sub>R</sub>= 10,58 min).

## **4.7. Estudos *In Vitro***

### **4.7.1. Determinação da Lipofilia pelo método de *shake flask***

A lipofilia do composto radioactivos de <sup>99m</sup>Tc (TcL3) foi avaliada por determinação do coeficiente de partição (log P<sub>o/w</sub>) no sistema bifásico n-octanol/PBS 0,1M pH 7,4 segundo o seguinte procedimento:

O coeficiente de partição (log P<sub>o/w</sub>) foi calculado pelo método de extracções múltiplas. Inicialmente, adicionou-se 1 mL de uma solução 0,1M de tampão PBS pH 7,4 a tubos de centrífuga contendo 1 mL de n-octanol e agitou-se em vórtex durante 1 minuto. Seguidamente, adicionaram-se 25 µL da preparação radioactiva em estudo, agitou-se novamente em vórtex durante 1 minuto e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente, de modo a obter uma separação eficiente entre a fase orgânica e a fase aquosa. Foram retiradas, de cada uma das fases (octanol e tampão PBS), alíquotas de 25 µL, e mediu-se a respectiva actividade. A actividade das diferentes alíquotas das fases orgânica e aquosa foi medida num contador de radiação gama (Berthold, LB21111, Germany). O coeficiente de partição (log P<sub>o/w</sub>) foi calculado aplicando a expressão:

$$\log P_{o/w} = \log \frac{C_1}{C_2} \quad (\text{Equação 1})$$

em que, C<sub>1</sub> = Actividade na fase orgânica (cpm), C<sub>2</sub> = Actividade na fase aquosa (cpm).

### 4.7.2. Estabilidade in vitro

#### 4.7.2.1. Estabilidade em PBS

O estudo de estabilidade em tampão PBS foi realizado adicionando 100 µL de tampão PBS 0,1 M pH= 7,4 a uma alíquota de 50 µL do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3) em estudo. A solução do composto TcL3 foi posteriormente incubada durante 1, 2, 4 e 24 horas em banho de água termostatizado a 37°C. Para os diferentes tempos foram retiradas alíquotas e analisadas por RP-HPLC.

#### 4.7.2.2. Estabilidade em Soro Humano e Determinação da ligação às proteínas plasmáticas

A um tubo contendo 500 µL de soro humano adicionou-se 50 µL do do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3) em estudo, e incubou-se num banho de água a 37°C durante 1, 2 e 4 horas. Decorridos esses tempos de incubação, retiraram-se alíquotas de 50 µL e a essas alíquotas foram adicionados 100 µL de etanol absoluto a 4°C, para precipitar a fracção proteica, e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Em seguida, separou-se o precipitado do sobrenadante e o precipitado foi lavado, duas vezes, com etanol (1 mL). O sobrenadante foi analisado por HPLC utilizando as condições experimentais descritas para o respectivo composto para avaliar a sua estabilidade radioquímica.

Para a determinação da percentagem de ligação às proteínas plasmáticas mediu-se na câmara de ionização a actividade da fracção proteica (actividade do precipitado e a actividade total da amostra). A percentagem da ligação às proteínas plasmáticas é determinada pelo quociente entre a actividade da fracção proteica e a actividade total e é expressa em percentagem.

### 4.7.3. Ligação à Hidroxiapatite

A adsorção à hidroxiapatite (HA) foi determinada seguindo um método já descrito na literatura <sup>[161]</sup>. Assim, foram adicionados 25 µL do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3) em estudo (ca. 27,8 µCi/25 µL) a 2,5; 10; 20; e 50 mg de HA, em 500 µL de tampão PBS pH = 7,4. Esta mistura foi incubada num banho de água a 37°C durante 1 h. Ao fim de 1 h de incubação, a mistura foi centrifugada (7500 rpm/ 3 min) e a fase líquida foi separada. A fase sólida foi lavada 2 vezes com 500 µL de tampão PBS (pH = 7,4), e a actividade foi medida numa câmara de ionização. A ligação à hidroxiapatite calcula-se conforme indicado na equação 2:

$$\% \text{ Ligação à Hidroxiapatite} = \frac{A(\text{sol})}{A(\text{total})} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

em que  $A(\text{sol})$  = actividade da fase sólida e  $A(\text{total})$  = actividade total

Alternativamente, a absorção do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  foi também calculada ao longo do tempo. Assim, 30  $\mu\text{L}$  do complexo TcL3 em estudo ( $\sim 27,9 \mu\text{Ci}/30 \mu\text{L}$ ) foram incubados com 15 mg de HA em 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS pH = 7,4, durante 0, 1, 2 e 4 horas num banho de água termostaticado a  $37^\circ\text{C}$ . As suspensões obtidas foram tratadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

## 4.8. Estudos *In Vivo*

Todas as experiências *in vivo* foram realizadas de acordo com os padrões da lei europeia relativos ao alojamento, cuidados e protecção dos animais para fins científicos (Decreto-lei 129/92 de 6 de Julho e 197/96 de 16 de Outubro da Portaria 1131/97, que transpõem para a ordem jurídica interna a Directiva Comunitária nº 86/609/CEE).

### 4.8.1. Ensaio de Biodistribuição

A biodistribuição *ex-vivo* do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  (TcL3) foi determinada em grupos de quatro a cinco ratinhos fêmea *Balb-c* (13 - 19 g). Os animais foram injectados por via intravenosa, na veia da cauda, com a preparação de TcL3, e mantiveram-se em condições controladas de temperatura, luz e humidade, e com uma dieta normal *ad libitum*.

Imediatamente após injeção mediu-se a actividade injectada em cada ratinho na câmara de ionização. Os animais foram depois sacrificados por deslocação cervical, 1 hora, 4 horas e 6,5 horas após injeção. De seguida, foram dissecados e recolheram-se os órgãos de interesse. A actividade em cada órgão foi medida numa câmara de ionização ou num contador gama (Berthold) e, após a determinação da respectiva massa, os resultados da biodistribuição foram expressos como uma percentagem da dose injectada por cada órgão (% A.I./órgão) ou por grama de órgão (% A.I./g órgão).

A excreção total da actividade assume-se como a diferença entre a actividade injectada no animal e a actividade medida imediatamente após o sacrifício do animal, expressa como percentagem da dose injectada (% A.I.).

**Tabela 4.1** - Resultados de biodistribuição (% A.I./órgão) após administração do complexo TcL3 em ratinhos *Balb-c*

Órgão	% A.I./órgão		
	1 h	4 h	6,5 h
Sangue	6,2 ± 1,9	1,07 ± 0,09	0,63 ± 0,04
Fígado	5,9 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Intestino	6,3 ± 0,9	9,0 ± 1,1	9,7 ± 1,9
Baço	0,03 ± 0,01	0,024 ± 0,002	0,02 ± 0,01
Coração	0,06 ± 0,04	0,024 ± 0,003	0,02 ± 0,01
Pulmão	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Rim	0,86 ± 0,06	0,61 ± 0,04	0,42 ± 0,06
Músculo	3,0 ± 0,7	2,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2
<b>Osso</b>	<b>14,8 ± 2,4</b>	<b>19,3 ± 1,6</b>	<b>14,1 ± 1,6</b>
Estômago	0,54 ± 0,07	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
<b>Excreção Total (% A.I.)</b>	<b>54,0 ± 4,6</b>	<b>57,6 ± 2,8</b>	<b>65,3 ± 2,7</b>

**Tabela 4.2** - Resultados de biodistribuição (% A.I./g órgão) após administração do complexo TcL3 em ratinhos *Balb-c*

Órgão	% A.I./ g órgão		
	1 h	4 h	6,5 h
Sangue	6,4 ± 2,1	1,11 ± 0,06	0,62 ± 0,04
Fígado	6,2 ± 1,2	2,7 ± 0,4	1,2 ± 0,1
Intestino	3,2 ± 0,4	4,5 ± 0,7	4,7 ± 0,7
Baço	0,4 ± 0,2	0,25 ± 0,06	0,3 ± 0,2
Coração	0,5 ± 0,3	0,17 ± 0,07	0,17 ± 0,06
Pulmão	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Rim	3,2 ± 0,5	1,9 ± 0,6	1,3 ± 0,4
Músculo	0,5 ± 0,2	0,36 ± 0,04	0,09 ± 0,02
<b>Osso</b>	<b>9,3 ± 2,1</b>	<b>12,1 ± 0,7</b>	<b>8,4 ± 1,5</b>
Estômago	6,4 ± 2,1	1,11 ± 0,06	0,62 ± 0,04

#### 4.8.2. Estabilidade In Vivo /Metabolização

A estabilidade *in vivo* do complexo TcL3 em estudo foi determinada por análise por RP-HPLC de amostras de urina e sangue. As amostras foram recolhidas após sacrifício dos ratinhos efectuado 1 hora após injeção do complexo em estudo.

A urina recolhida no momento do sacrifício foi previamente centrifugada durante 10 min a 2000 rpm, e o sobrenadante foi analisado por HPLC.

As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas durante 15 min, a 3000 rpm e a 4°C. O soro foi separado e pequenas alíquotas tratadas com etanol frio, numa razão de 2:1 (v/v de etanol/soro), para precipitar as proteínas. As amostras foram novamente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC.

#### 4.9. Estudos em Linhas Celulares

##### *Linhas Celulares:*

As linhas celulares utilizadas na avaliação dos compostos descritos neste trabalho foram as MDAMB231 - linha celular derivada da mama humana com características metastáticas.

##### *Cultura de Células:*

As células ( $2 \times 10^4$  células/200 µL) foram cultivadas em placas de 96 poços, no meio de cultura DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% solução de antibióticos estreptomicina/penicilina e incubadas a 37°C por 24 h numa estufa de CO<sub>2</sub> antes da adição dos compostos para permitir a aderência. Poços sem composto serviram de controlo.

##### 4.9.1. Inibição do crescimento celular (MTT)

A inibição da proliferação celular dos compostos foi avaliada em células MDAMB231, uma linha celular derivada da mama humana com características metastáticas, usando o método do MTT.

Os compostos L<sup>1</sup>, L<sup>3</sup>, ReL1 e ReL3 previamente solubilizados em água (L<sup>1</sup> e L<sup>3</sup>) ou DMSO (ReL1 e ReL3) foram diluídos no meio das células na gama de concentrações (0,2 - 200 µM), adicionados às células e incubados por 72 h. Após este tempo de exposição o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução de 200 µL MTT (0,5 mg/mL PBS). Esta solução foi incubada com as células por 3-4 h a 37°C. Os cristais de formazan foram dissolvidos com 200 µL DMSO e a absorvância de cada poço foi medida num espectrofotómetro de placas (Power Wave Xs, Bio-Tek) a 570 nm.

A percentagem da densidade óptica em função da concentração de composto foi representada em gráfico semilog, no entanto não foi possível determinar o valor de IC<sub>50</sub> a partir das curvas de dose-resposta, pois o comportamento dos compostos não permite traçar uma curva. Os resultados são expressos em percentagem de viabilidade celular relativa ao controlo (na ausência dos compostos).



## Capítulo 5

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 5. Referências Bibliográficas

- [1] Giorgio, V. et al., *Management of bone metastases in cancer: A review*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 56, 2005, no. 3, pages 365-378.
- [2] Costa, L. et al., *Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases*, Nat Clin Pract Oncol 6, 2009, no. 3, pages 163-174.
- [3] Darnell, J. et al., *Molecular Cell Biology*, Sci. Am. Books, 1995.
- [4] Alberts, B. et al., *Essential cell biology*, Garland Science, 2ª ed., 698 - 736, 2004.
- [5] Bartsch, R. et al., *Intensified local treatment and systemic therapy significantly increase survival in patients with brain metastases from advanced breast cancer - a retrospective analysis*, Radiot. Oncol., 2006, 80, pages 313-317.
- [6] Langer, M. et al., *Novel peptide conjugate for tumor-specific chemotherapy*, J. Med. Chem., 2001, 44, pages 1341-1348.
- [7] Seeley, R. et al., *Anatomia e Fisiologia.*, Lusodidacta, 1.ª ed, Lisboa 1997.
- [8] Kowalsky, R. et al., *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*, APhA Publications, 2nd Edition, 2004.
- [9] Sadler, P. et al., *Metallopharmaceuticals II: Diagnosis and Therapy*, (Topics in Biological Inorganic Chemistry, 2), Springer, 1999.
- [10] Saha, G.B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer, 5th Edition, 2005.
- [11] Perkins, A.C., *In vivo molecular targeted radiotherapy*, Biomed Imaging Interv J 1, 2005, no. 2, pages 1-6.
- [12] Blower, P., *Towards molecular imaging and treatment of disease with radionuclides: the role of inorganic chemistry*, Dalton Trans, 2006, no. 14, pages 1705-1711.
- [13] Adaptado de <http://science.howstuffworks.com/nuclear1.htm>
- [14] Gopal B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer, Fifth Edition, 2004.
- [15] Liu, S. et al., *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals*, Chem Rev, 1999, 99, pages 2235-2268.
- [16] Schibli, R. et al., *Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals*, Eur. J. Nucl. Med., 2002, 29(11), pages 1529-1542.
- [17] Bartsch R et al., *Intensified local treatment and systemic therapy significantly increase survival in patients with brain metastases from advanced breast cancer - a retrospective analysis*, Radiot. Oncol., 2006, 80, pages 313-317.

- [18] Welch, M. et al., *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications*. Wiley. England; 2003.
- [19] Liu, S., *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chem. Soc. Rev., 2004, 33, pages 445 - 461.
- [20] Liu, S. et al., *<sup>99m</sup>Tc Labeling of Highly Potent Small Peptides*, Bioconjugate Chem. 1997, 8, pages 621 - 636.
- [21] Alberto, R., *New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging*, Top. Curr. Chem., 2005, 252, pages 1 - 45.
- [22] Blok, D. et al., *Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine*, Euro. J. Nucl. Med., 1999, 26, pages 1511 - 1519.
- [23] Morris, V. et al., *Rhenium-188(Sn)HEDP for treatment of osseous metastases*, J Nucl Med, 1998, 39, pages 659-663
- [24] Krenning E. P. et al, *A pragmatic perspective on molecular targeted radionuclide therapy*, J. Nucl. Med., 2005, 46(1), 1S-3S
- [25] Coleman, R. E., *Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies*, Cancer Treat Rev 27, 2001, no. 3, pages 165-176.
- [26] Suva, L. J. et al., *Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities* Nat. Rev. Endocrinology, 2011.
- [27] Giorgio V. et al., *Management of bone metastases in cancer: A review*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 56, 2005, no. 3, 365-378.
- [28] Paes, F. et al., *Systemic metabolic radiopharmaceutical therapy in the treatment of metastatic bone pain*, Semin Nucl Med 40 (2010), no. 2, 89-104.
- [29] Bodei, L. et al., *EANM procedure guideline for treatment of refractory metastatic bone pain*, Eur J Nucl Med Mol Imaging 35, 2008, no. 10, pages 1934-1940.
- [30] Christo, P. J. et al., *Cancer pain and analgesia*, Ann N Y Acad Sci 1138, 2008, pages 278-298.
- [31] Hirabayashi, H. et al., *Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents*, Clin Pharmacokinet 42, 2003, no. 15, pages 1319-1330.
- [32] Wang, D. et al., *Bone-targeting macromolecular therapeutics*, Adv Drug Deliv Rev 57, 2005, no. 7, pages 1049-1076.
- [33] Raggatt, Liza J. et al., *Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling*, Journal of Biological Chemistry 285, 2010, no. 33, pages 25103-25108.
- [34] Blower, P., *Towards molecular imaging and treatment of disease with radionuclides: the role of inorganic chemistry*, Dalton Trans, 2006, no. 14, pages 1705-1711.
- [35] Shinoda, H. et al., *Structure activity relationships of various bisphosphonates*, Calcif Tissue Int 35, 1983, no. 1, pages 87-99.

- [36] Santos, I., et al., *Bisphosphonates as radionuclide carriers for imaging or systemic therapy*, The Royal Society of Chemistry, 2011
- [37] Russell, R. et al., *Bisphosphonates*, Annals of the New York Academy of Sciences 1068 (2006), no. 1, pages 367-401.
- [38] Roelofs, A. J. et al., *Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status*, Clin Cancer Res 12, 2006, no. 20 Pt 2, 6222s-6230s.
- [39] Vallet, S. et al., *Novel bone-targeted strategies in oncology*, ClinCancer Res 16, 2010, no. 16, pages 4084-4093.
- [40] Brunton, L.L. et al., *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*, Artmed, 2010, pages 1507-1508.
- [41] Garcia, R. et al., *Synthesis and biological evaluation of tricarbonyl Re(I) and Tc(I) complexes anchored by poly(azolyl)borates: application on the design of radiopharmaceuticals for the targeting of 5-HT<sub>1A</sub> receptors*, J Biol Inorg Chem, 2006, 11, pages 769-782
- [42] Paes, F. et al., *Systemic metabolic radiopharmaceutical therapy in the treatment of metastatic bone pain*, Semin Nucl Med 40, 2010, no. 2, pages 89-104.
- [43] Palma E., *Complexos Organometálicos de Re e Tc com propriedades osteotrópicas para Imagiologia e/ou Terapia*, PhD Thesis, Universidade de Lisboa, October 2011.
- [44] Blower, P., *Bifunctional bisphosphonate complexes for the diagnosis and therapy of bone metastases*, Chem.Commun, 2009, pages 4847-4849
- [45] Love, C. et al., *Radionuclide bone imaging: an illustrative review*, Radiographics 23, 2003, no. 2, pages 341-358.
- [46] Lewington, V. J., *Bone-seeking radionuclides for therapy*, J Nucl Med 46 Suppl 1, 2005, 38S-47S.
- [47] Alberto, R., *Comprehensive coordination chemistry II*, J. A. M. McLverty, T.J. (Editor), vol. 5, Elsevier-Pergamon, Amsterdam, 2004, pages 127-270.
- [48] Klerk, J. M. et al., *Pharmacokinetics of rhenium-186 after administration of rhenium-186-HEDP to patients with bone metastases*, J Nucl Med 33, 1992, no. 5, 646-651.
- [49] Blower, P. J. et al., *<sup>188</sup>Re(CO)<sub>3</sub>-dipicolylamine-alendronate: a new bisphosphonate conjugate for the radiotherapy of bone metastases*, Bioconjug Chem 21, 2010, no. 5, pages 811-815.
- [50] Kieczkowski, G. R. et al., *Preparation of (4-amino-1-hydroxybutylidene) bisphosphonic acid sodium salt, MK-217 (alendronate sodium). An improved procedure for the preparation of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonic acids*, Journal of Organic Chemistry 60, 1995, no. 25, pages 8310-8312.
- [51] Lazarova, N. et al., *A convenient synthesis, chemical characterization and reactivity of [Re(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]Br: the crystal and molecular structure of [Re(CO)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>CN)<sub>2</sub>Br]*, Inorg Chem Commun, 2004, 7, pages 1023-1026

- [52] Fritzberg, A. et al., *Synthesis and Biological Evaluation of Technetium-99m MAG<sub>3</sub> as a Hippuran Replacement*, J Nucl Med, 1986, 27, pages 111-116
- [53] Eshima, D. et al., *Effect of protein binding on renal extraction of I-131-OIH and Tc-99m-labeled tubular agents*, J Nucl Med, 2000, 41, pages 2077-2082
- [54] Troutner, D. E. et al., A neutral lipophilic complex of <sup>99m</sup>Tc with a multidentate amine oxime. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 1984, 35, (6), pages 467-470.
- [55] <http://www.cyberlipid.org/phlipt/pl2a0006.htm>
- [56] López, P. et al., *N-2-(Azol-1(2)-yl)ethyliminodiacetic acids: a novel series of Gd(III) chelators as T2 relaxation agents for magnetic resonance imaging*, Bioorg Med Chem, 1999, 7, pages 517-527
- [57] Mougenout, P. et al., *α-ω- Difunctional Perfluorinated Spacer Arms for Polymeric Material Derivatization*, J Org Chem, 1996, 61, pages 408-412
- [58] Krapcho, AP et al., *Mono-Protected Diamines. N-tert-Butoxycarbonyl α,ω -Alkanediamines from α,ω -Alkanediamines*, Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry, 1990, 20 (16), pages 2559 - 2564
- [59] Alves, S. et al., *Pyrazolyl derivatives as bifunctional chelators for labeling tumor-seeking peptides with the fac-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> moiety (M=Tc-99m, Re): Synthesis, characterization, and biological behaviour*, Bioconjugate Chem, 2005, 16, pages 438-449
- [60] Unak P., *Targeted Tumor Radiotherapy*, Braz. Arch. Biol. Technol., 45, 97-110, 2002.
- [61] Perrin, D. D. et al., *Purification of Laboratory Chemicals*. 3rd ed.; Permagon Press: Oxford, 1988.